

**Ribosomale Proteine von *Lactobacillus viridescens*:
Abbau und Synthese unter dem Einfluß von Vitamin B₁**

von

Wolfgang Friedrich Wilhelm Loh
aus Düsseldorf - Kaiserswerth



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Ribosomale Proteine von *Lactobacillus viridescens*:
Abbau und Synthese unter dem Einfluß von Vitamin B₁**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Wolfgang Friedrich Wilhelm Loh
aus Düsseldorf - Kaiserswerth

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 1973

Dekan: Prof. Dr. W. Heumann

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kersten

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Heumann

Meinen lieben Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1969 bis November 1972 im Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Frau Prof. Dr. H. Kersten danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die fördernde Unterstützung. Dank ihrer Hilfe konnten für die Durchführung der Versuche die Sachmittel von der DFG erhalten werden.

Für fruchtbare Diskussionen und zahlreiche Anregungen darf ich allen Mitarbeitern des Institutes und besonders Herrn Dr. L. Bohne danken.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	4
1. Medien und Chemikalien	4
2. Zuchtbedingungen	5
3. Aufschluß der Zellen und Präparation der 70S-Ribosomen	9
4. Präparation der ribosomalen Untereinheiten	11
4.1. Ermittlung des Gradienten und der Elutionsmethode	11
4.2. Trennung der ribosomalen Unterein- heiten	15
5. Charakterisierung der Ribosomen und ribo- somalen Untereinheiten	18
6. Präparation der ribosomalen Proteine	20
7. Analyse der ribosomalen RNA	22
8. Acrylamidgel-Elektrophorese der ribosoma- len Proteine	23
8.1. Elektrophorese in der ersten Dimension	23
8.2. Elektrophorese in der zweiten Dimension	28
9. Bestimmung der Radioaktivität	31
10. Aminosäureanalyse der 70S-ribosomalen Proteine	32
C. Ergebnisse	33
1. Untersuchungen an Ribosomen aus Zellen, gewachsen bei Thiamin-Sättigung (Optimal- Zellen)	33
1.1. Wachstum von <i>L. viridescens</i>	33
1.2. Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und ribosomalen Proteinen	36

	Seite
1.3. Muster der ribosomalen Proteine	42
1.3.1. Zweidimensionale Acrylamidgel-Elektrophorese der ribosomalen Proteine	42
1.3.2. Vergleich der Muster der ribosomalen Proteine aus <i>L. viridescens</i> und <i>E. coli</i>	57
1.4. Aminosäureanalyse der ribosomalen Proteine	64
2. Veränderungen an Ribosomen aus Thiamin-Mangel-Zellen und Restaurations-Zellen	66
2.1. Quantitative Auswertung der Präparationsstufen	66
2.2. Elektrophoretische Analyse der ribosomalen RNA	68
2.3. Vergleichende Gradientenzentrifugation der ribosomalen Untereinheiten	72
2.4. Elektrophoretische Trennung der Proteine der 70S-Ribosomen	77
2.5. Analyse der Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Proteine	84
3. Synthese und Einbau ribosomaler Proteine in Ribosomen während der Restaurations-Phase	86
3.1. Markierung der ribosomalen Proteine	86
3.2. Gradientenzentrifugation der Ribosomen	88
3.3. Elektrophoretische Trennung der ribosomalen Proteine	94
D. Diskussion	99
1. Die ribosomalen Proteine aus <i>Lactobacillus viridescens</i> im Vergleich zu ribosomalen Proteinen aus <i>Escherichia coli</i>	101
2. Veränderungen an Ribosomen durch Thiamin-Mangel	103
3. Synthese und Einbau ribosomaler Proteine in ribosomale Partikel während der Restauration	109
E. Zusammenfassung	113
F. Literatur	116

A. Einleitung

Lactobacillus viridescens ist ein heterofermentatives, anaerobes und Thiamin (Vitamin B₁) auxotrophes Säurebakterium⁹⁴). Es wurde als einfacher Organismus gewählt, um Folgen von Thiamin-Mangelerscheinungen auf den Stoffwechsel von Ribonucleinsäuren und Proteinen näher zu untersuchen.

Die Zellvermehrung des Mikroorganismus' ist streng abhängig vom Thiaminangebot im Medium. Ohne Thiamin teilen sich die Zellen nicht, bleiben aber lebensfähig. Während des Thiamin-Mangels werden die für die Proteinbiosynthese benötigten Zellorganellen - die Ribosomen - abgebaut, ihr Gehalt sinkt auf ungefähr 40 % ab^{49, 59}). Die Ribosomen aus Mangel-Keimen unterscheiden sich von Ribosomen aus mit Thiamin gesättigten Zellen: physikalisch durch veränderte Sedimentationseigenschaften und funktionell durch ihre stark verminderte Aktivität im zellfreien Proteinbiosynthese-System⁴⁹).

Nach intensivem Thiamin-Mangel teilen sich die Zellen auch nach Zugabe hoher Dosen Thiamin in den ersten zwei Stunden der Erholung (Restaurations-Phase) nicht. Es beginnt aber sofort die Synthese von ribosomalen Ribonucleinsäuren und ribosomalen Proteinen^{49, 59}).

Die Ribosomen der Bakterien bestehen zu etwa 60 % aus Ribonucleinsäuren und zu 40 % aus Proteinen. Je nach ihrer Größe unterscheidet man drei Typen von ribosomalen Ribonucleinsäuren, die 5S-, die 16S- und die 23S-ribosomalen Ribonucleinsäuren (rRNA)⁹⁸). Die 5S-rRNA hat ein Molekulargewicht von 40 000 Daltons, die 16S-rRNA ein Molekulargewicht von 550 000 Daltons und die 23S-rRNA ein Molekulargewicht

von 1 100 000 Daltons⁶⁴). Die 16S-rRNA bildet mit rund 21 Proteinen (Molekulargewichte zwischen 65 000 und 11 000 Daltons) einen Komplex, der in der analytischen Ultrazentrifuge mit einer Sedimentationskonstante von 30 S sedimentiert. Dieser Komplex wird die 30S-Untereinheit des Ribosoms genannt. Die 23S- und 5S-rRNA und rund 34 Proteine (Molekulargewichte zwischen 31 500 und 9 500 Daltons) bilden zusammen die 50S-Untereinheit. Beide ribosomale Untereinheiten assoziieren zum 70S-Ribosom und bilden so das aktive Organell für die Proteinbiosynthese^{28, 116}).

Nach intensivem Thiamin-Mangel ist der Ribosomengehalt in den Zellen vermindert; die rRNAs in den noch verbleibenden nicht abgebauten Ribosomen zeigten keine Veränderungen⁵⁹). Daher wurde vermutet, daß entweder den Ribosomen einige ribosomale Proteine fehlen oder verändert sind oder daß nur die Konformation der Ribosomen verändert ist und dadurch ihre Aktivität im Proteinbiosynthese-System verloren ging.

Nach Zugabe von Thiamin zu Mangel-Keimen werden in der Restaurations-Phase 16S- und 23S-rRNAs im Verhältnis 1:1 synthetisiert. Auch die Synthese ribosomaler Proteine beginnt innerhalb von 10 Minuten. Es werden ribosomale Partikel gebildet, die mit 70S in der Ultrazentrifuge sedimentieren und im Proteinbiosynthese-System aktiv sind^{48, 49, 59}).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel:

1. das Muster ribosomaler Proteine und seine Veränderungen durch Thiaminmangel in *Lactobacillus viridescens* näher zu untersuchen,
2. die Neusynthese ribosomaler Proteine und ihre Inkorporation in Ribosomen während der Restauration vom Thiaminmangel zu studieren.

Es wurden zunächst die ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* analysiert. Als Vergleich dienten Ribosomen und ribosomale Proteine aus Zellen, die bei optimalen Thiamin- und Nahrungs-Konzentrationen gewachsen waren. Das zweidimensionale Muster der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* wurde mit der Technik von K a l t s c h m i d t und W i t t m a n n ⁵²⁾ zum erstenmal erstellt und mit dem bekannten Muster von *Escherichia coli* verglichen. Der Vergleich der Muster der ribosomalen Proteine aus Zellen, die einem intensiven Thiamin-Mangel ausgesetzt waren, ergaben Veränderungen im Muster ribosomaler Proteine. In Zellen, die sich - nach Zugabe von Thiamin - vom Thiamin-Mangel erholen, konnte die Neusynthese der ribosomalen Proteine und ihr Einbau in ribosomale Partikel verfolgt werden.

B. Material und Methoden

1. Medien und Chemikalien

Lacobacillus viridescens (S38, A) ATCC 12706 wurde geliefert von der Torry-Research Station, Aberdeen, Scotland. Bacto APT Broth dehydrated (= APT), Bacto Thiamin Assay Medium LV dehydrated (= TAM) und Bacto-Agar wurden von DIFCO-Laboratories, Detroit, Mich. USA, bezogen. Die Bestellnummern sind: APT = 0655, TAM = 0808 und Agar = 0140.

Aluminiumoxid Alcoa A-305, Amidoschwarz 10B, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (= Bis), N,N,N',N'-Tetramethylacrylamid (= TEMED) und Riboflavin stammten von SERVA, Heidelberg.

2-Mercapto-Äthanol lieferte FLUKA AG.

Desoxyribonuclease I (= DNase I) kam von Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey USA.

Soluene 100 wurde von Packard Instruments bezogen.

Alle radioaktiv markierten Aminosäuren stammen vom Radiochemical Centre, Amersham und alle übrigen Chemikalien von Merck.

Alle Lösungen wurden mit frisch destilliertem Ionenaustauscherwasser angesetzt.

2. Zuchtbedingungen

Die Medien und Zuchtbedingungen für *Lactobacillus viridescens* sind im wesentlichen beschrieben^{49, 59)}.

Alle Geräte wie Pipetten, Zuchtgefäße, Zentrifugenbecher oder andere Glasgeräte, die während der Züchtung mit den Zellkulturen in Berührung kamen, wurden mindestens zehnmal mit frisch destilliertem Ionenaustauscherwasser gespült (= thiaminfrei) und anschließend gleich verschlossen. Soweit die Geräte nicht Lösungen enthielten, wurden sie im Autoklaven zweimal je 1 bis 2 Stunden bei 120 °C und 2 atü sterilisiert, auch um letzte Thiaminspuren zu zerstören. Zwischen den beiden Sterilisationsvorgängen kühlten die Geräte mindestens 8 Stunden ab.

APT-Medien waren steril nach zweimaligem Autoklavieren (je 15 Minuten bei 120 °C und 2 atü). TAM-Medien wurden ebenso sterilisiert oder zunächst mit 1 bis 2 atü durch einen sterilen Seitz-Filter gedrückt und anschließend nur einmal wie APT-Medien sterilisiert. Die Kaltsterilisation ist für APT-Medien nicht geeignet, da der Filter Thiamin adsorbiert. Alle Medien kühlten nach der ersten Heißsterilisation mindestens 12 Stunden ab. Nach der zweiten Heißsterilisation wurden sie mindestens zwei Tage im Brutraum bei 37 °C inkubiert, um eine Kontamination mit Fremdsporen ausschließen zu können.

Den TAM-Medien wurde Thiamin aus Thiaminstammlösungen steril zugesetzt. Die Sterilisation der Thiaminstammlösungen erfolgte durch zweimaliges Erhitzen von je 15 Minuten im 100°C-Wasserbad mit einer Abkühlzeit von 6 Stunden. Die Lösungen wurden bei 4 °C aufgehoben.

Soweit nicht anders angegeben, setzten sich die Medien wie folgt zusammen:

APT-Medium: 4,62 g APT in 100 ml H₂O

TAM-Medium: 4,20 g TAM in 100 ml H₂O

APT-Agar: 1,5 g Agar in 100 ml APT-Medium (für Platten- oder Schrägkulturen)

Thiamin- Lösung I:

Stamm- 50 mg Thiamin in 500 ml H₂O = 100 µg/ml

lösungen:

Lösung II:

1,0 ml von Lösung I in 100 ml H₂O = 1 µg/ml

Lösung III:

10 ml von Lösung II in 100 ml H₂O = 100 ng/ml.

Alle Züchtungen des *Lactobacillus viridescens* wurden bei 30 °C durchgeführt.

Optimal-Zellen sind in APT-Medien bei 100 ng Thiamin pro ml Medium bis zur Mitte der logarithmischen Wachstums-Phase gewachsen. Die Wachstumsdauer betrug rund 12 Stunden. Für Züchtungen von bis zu 16 Liter-Ansätzen wurden Vorkulturen in 10 ml APT-Medium angelegt und mit diesen die großen Zuchtgefäße angeimpft.

Mangel-Zellen wuchsen zunächst in TAM-Medien mit 5 ng Thiamin/ml Medium bis zur extremen Ruhe-Phase, wurden steril abzentrifugiert (1 h bei 3 000 g in der Mistral L 6), mit steriler 0,85%iger Kochsalz-Lösung zweimal gewaschen und in doppeltem Volumen TAM-Medium ohne Thiamin suspendiert. Vor der Ernte wurden die Zellen dann mindestens 14 Stunden ohne Thiamin bei 30 °C gehalten.

Restaurations-Zellen waren mindestens 14 Stunden einem Thiamin-Mangel ausgesetzt und dann 45 Minuten mit 100 ng Thiamin/ml Medium inkubiert. Nach 45 Minuten „lag“-Phase, in der sich die Zellen noch nicht teilen⁵⁹⁾, wurden die Zellkulturen schnell abgekühlt und die Zellen mit der vorgekühlten Mistral L 6 geerntet.

Die Neusynthese und der Einbau der ribosomalen Proteine während der Restaurationsphase ließ sich durch Zugabe von ^3H - oder ^{14}C -markiertem Leucin und Aminosäure-Hydrolysat verfolgen. Da das TAM-Medium Aminosäuren in hohen Konzentrationen enthält (Tabelle 1), ist ein Einbau von radioaktiven Aminosäuren in ribosomale Proteine von *Lactobacillus viridescens* sehr schwierig und aufwendig. Die beste Markierung

Tabelle 1: Aminosäure-Konzentration im TAM-Medium
(nach Angaben von DIFCO-Laboratories)

4,2 g Trockenmedium, die in 100 ml H_2O gelöst werden, enthalten 1,5 g Bacto-Trypton und Bacto-Hefeextrakt. Die Analysen von DIFCO erfassen hieraus 0,93 g Aminosäure-Gemisch mit folgender Zusammensetzung:

in 100 ml TAM-Medium enthalten			
Aminosäure	mg	nMol	Mol%
Arg	35	200,9	3,0
Asp	85	638,6	9,4
Glu	222,5	1522,4	22,5
Gly	32,5	432,9	6,4
His	25	161,1	2,4
Ile	65	495,5	7,3
Leu	102,5	781,4	11,5
Lys	90	615,6	9,1
Met	25	167,5	2,5
Phe	50	302,7	4,5
Thr	47,5	398,8	5,9
Tyr	72,5	400,1	5,9
Val	<u>77,5</u>	<u>661,5</u>	<u>9,8</u>
	930,0	6779,0	100,2

Ala, Cys, Pro, Ser und Trp sind in den Angaben von DIFCO nicht enthalten.

der Proteine wurde mit einer Mischung aus ^{14}C -Leucin (0,4 mCi, 305 mCi/mMol) und ^{14}C -Protein-Hydrolysat (0,25 mCi, 57 mCi/mMol) in 8 l TAM-Medium erreicht. Da TAM leider nicht ohne Aminosäuren herzustellen ist, befand sich in dem hier verwendeten Medium nur 50 % TAM, um die „kalten“ Aminosäuren etwas zu verdünnen (4 l TAM-Medium + 4 l 0,85%ige NaCl).

Zur Ernte der Bakterien aus den Zuchtmedien werden die Zellen in der Mistral L 6 bei 3 000 g 1 Stunde sedimentiert, mit kalter 0,85%iger NaCl gewaschen und noch einmal scharf abzentrifugiert (MSE 25, 10 000 g, 10 Min). Das Feuchtgewicht der geernteten Zellen wird bestimmt und die Bakterien bei - 35 °C eingefroren und aufgehoben.

Die Thiaminabhängigkeit des Stammes *Lactobacillus viridescens* wurde immer wieder geprüft. Das Wachstum bei niedrigen Thiamin-Konzentrationen (2,5, 5, 10, 25 und 50 ng Thiamin/ml Medium) wurde in 10 ml-Bakterienzuchtgläsern beobachtet. Zur Prüfung der Teilungsfähigkeit von Zellkulturen wurden Ausstriche auf APT-Agarplatten bei 30 °C 2 Tage inkubiert. Es waren dann kleine gelblich-weiße, runde, gut abgesetzte Kolonien mit ganz zartem, durchsichtigen Hof gewachsen.

Das Wachstum der Zellkulturen wurde im allgemeinen durch Messen des Streulichtes einer Probe in einem Schott-Duran-50-Glas bei 578 nm im Eppendorf-Photometer mit Küvettenhalter 115320 kontrolliert. Die Zelldichte wird mit dieser Methode annähernd gut festgestellt; Fehler können durch geringfügige Verschiebung des Küvettenhalters entstehen, da die Gläser rund sind und sich so die maximale Schichtdicke von rund 1,5 cm sehr stark verändert. Vergleichend zur Streulicht-Messung wurden die Zelldichten aber auch in 1 cm Glas-Küvetten bei 578 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt und ergänzend die Zellzahl/ml in Abhängigkeit von den Streulicht-Messungen ermittelt (nach ²⁶).

3. Aufschluß der Zellen und Präparation der 70S-Ribosomen

Die notwendigen Puffer und Lösungen werden mit einem Stamm-Puffer angesetzt:

Stamm-Puffer (= St-P): 0,01 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,
0,06 M KCl, 0,006 M Mercapto-Äthanol,
pH 7,8

Extraktions-Puffer
(= E-P) : 0,01 M Mg-Azetat in St-P

Dissoziations-Puffer : 0,03 M NH_4Cl , 0,3 mM Mg-Azetat in St-P
(= D-P) (20, 39, 40, 60, 93)

2 molare Ammonium-
chlorid-Lösungen : 2,0 M NH_4Cl und
(= 2M NH_4Cl) 0,01 M Mg-Azetat in St-P

1 molare Mg-Azetat-
Lösung
(= 1 M Mg-Az) : 1,0 M Mg-Azetat in St-P

Desoxyribonuclease I
(= DNase I) : 0,1%ige Lösung in E-P

1 molare Saccharose-
Lösung : 1,0 Saccharose für die Dichte-
(= 1 M Sa) zentrifugation in E-P

Alle Präparationsschritte erfolgen zwischen 0° und 4 °C.

Die Methode entspricht außer geringfügigen Modifikationen Standardbedingungen¹¹⁶⁾. 1 Gewichtsanteil (= Feuchtgewicht)

Bakterien werden mit 3 Gewichtsanteilen Alcoa im vorgekühlten Mörser 10 Minuten kräftig gerieben, bis ein homogener Brei entsteht. Dieser wird mit 3fachem Volumen E-P in ml wie eingesetztes Bakterienfeuchtgewicht in g in Zentrifugenbecher überführt, mit 5 bis 10 μg DNase I/ml Suspension versetzt und 20 Minuten in der Kälte inkubiert.

Nach der ersten Zentrifugation (10 000 g, 10 Min) wird der gelbe Überstand mit 1/5 Volumen 2 M NH_4Cl auf 0,4 M NH_4Cl gebracht⁴²⁾ und durch 2 weitere Zentrifugationsschritte (20 000 g, 20 Min; 30 000 g, 30 Min) gereinigt. Aus dem ge-

reinigten Überstand (= S30) werden die Rohribosomen sedimentiert (150 000 g, 3 h)^{27, 41, 98}). Der Überstand (= S150) wird dekantiert und sofort eingefroren. Das Sediment der Roh-Ribosomen (= P 150) wird im 1/2 Volumen D-P in ml wie in die Präparation eingesetzte Bakterien in g vorsichtig mit einem Glasstempel suspendiert. Nach 2 Stunden Suspension kann man Proben für die Präparation der ribosomalen Untereinheiten entnehmen. Danach wird die Mg^{2+} -Konzentration vor der Reinigung der 70S-Ribosomen mit 1 M Mg-Az auf 0,01 M erhöht⁶⁰⁾, die Suspension zur Reaggregation der Ribosomen 14 Stunden im Kühlschrank aufgehoben und wiederholt gerührt¹¹⁶⁾. Die Reinigung der Roh-Ribosomen geschieht durch Sedimentation durch 2 Volumen 1 M Sa bei 190 000 g und mindestens 9 Stunden. Das resultierende Sediment ist glasklar und wird nach 2maligem Abspülen mit wenig E-P in 1/4 Volumen E-P in ml wie eingesetzte Bakterien in g suspendiert.

4. Präparation der ribosomalen Untereinheiten

Zur Trennung der ribosomalen Untereinheiten diente die Technik der Saccharose-Dichte-Zentrifugation. Hierzu wurden verschiedene Gradientenformen, Zentrifugationsbedingungen und Elutionsmethoden ausprobiert.

4.1 Ermittlung des Gradienten und der Elutionsmethode

Alle Saccharose-Lösungen wurden in D-P (siehe oben) angesetzt. Die Gradienten umfaßten entweder 20 ml und wurden dann im 3 x 23 ml Ausschwingrotor bei 29 000 upm = 90 000 g bei 4 °C (MSE 65) zentrifugiert, oder sie waren aus 18 ml Saccharose-Lösungen hergestellt und wurden bei 24 000 upm = 80 000 g bei 4 °C im 4 x 20 ml Ausschwingrotor (MSE 25) zentrifugiert.

In der Literatur werden für diverse Fragestellungen verschiedene Gradientenformen beschrieben. Hier blieben die Dichte-Gradienten allein auf die lineare Form beschränkt. Variiert wurde die Steilheit der Gradienten von 5 bis 20 % bis 9 bis 45 % Saccharose. Der optimale Gradient wurde empirisch ermittelt. Kriterien für die Wahl des optimalen Gradienten waren Beladbarkeit und Trennschärfe. Je steiler die Zunahme der Dichte in einem Saccharose-Gradienten, um so schärfer bandieren die in ihm getrennten biologischen Komponenten⁷⁹).

5 bis 20%ige, 5 bis 30%ige und 5 bis 40%ige Gradienten (20 ml) wurden zunächst ausprobiert und jeweils 5, 10 und 15 h zentrifugiert. Die besten Trennungen waren im analytischen Maßstab durch den 5 bis 40%igen Gradienten zu erhalten.

Später wurden für alle präparativen Läufe der Untereinheiten 9 bis 45%ige Saccharose-Dichte-Gradienten in der MSE 65 bzw. 13 bis 45%ige Saccharose-Dichte-Gradienten in der MSE 25 gewählt (siehe auch ⁷⁾).

Anfänglich wurden die Gradienten in einer Mischkammer nach ⁸⁾ im Kühlraum bei 4 °C direkt vor Gebrauch hergestellt. Später, als der optimale Gradiententyp ermittelt war, wurden größere Bestände bereitet und eingefroren und vor Gebrauch aufgetaut ¹⁰³⁾. Diese Methode der Gradientenbereitung ist recht vorteilhaft, da ein Vorrat gleichförmiger Gradienten bei Zimmer-Temperatur vorbereitet werden kann und bei Bedarf jederzeit zur Verfügung steht. Hierzu werden 10 Saccharose-Lösungen in 4%igem Konzentrationsabstand hergestellt. Je 2,0 ml der Saccharose-Lösungen werden mit Vollpipetten in absteigenden Konzentrationen in Gradienten-Zentrifugenbechern überschichtet. Die „Stufengradienten“ bleiben 16 h bei Zimmer-Temperatur stehen, um durch Diffusion Linearität der Dichte zu erhalten. Bei - 50 °C werden dann die senkrecht stehenden Gradienten eingefroren und bis zum Gebrauch aufbewahrt. Vor Gebrauch werden die Gradienten-Zentrifugenbecher direkt in den Ausschwingbechern bei Zimmer-Temperatur rund 2 h aufgetaut, im Kühlschrank auf 4 °C vorgekühlt (2 h) und nach dem Überschichten mit der Probe mit 5%iger Saccharose in D-P austariert.

Durch den Einfrier-Auftau-Zyklus der Gradienten wird ein durchaus günstiger Effekt erreicht. Wie die Autoren dieser Methode ausführlich untersucht haben und beschreiben ¹⁰³⁾, werden die Salze im Gradienten neu verteilt. So nehmen die Salzkonzentrationen im oberen Teil des Gradienten (= niedrige Saccharose-Konzentration) ab und im unteren Teil (= hohe Saccharose-Konzentration) zu. Daher wird im oberen Teil die Dissoziation der Ribosomen noch weiter gefördert ²⁷⁾, sollte sie durch die Vorbehandlung mit D-P noch nicht quantitativ sein. Im unteren Teil des Gradienten wirkt die höhere Salz-

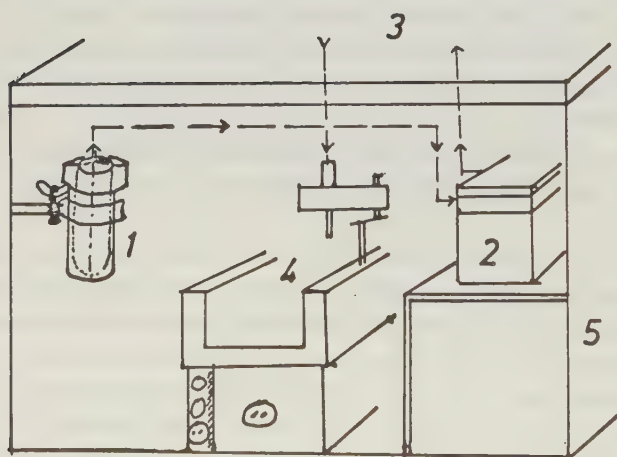
konzentration einer Auffaltung und Degradation der Ribosomen entgegen¹¹⁶⁾. So kann die Mg^{2+} -Konzentration im oberen Fünftel des Gradienten rund $1,5 \times 10^{-4}$ M und im unteren Teil bis zu 4×10^{-4} M betragen (nach Angaben aus¹⁰³⁾ berechnet).

Anfänglich wurden nach Beendigung der Zentrifugation die Becher am Boden angestochen und die Gradienten tropfenweise eluiert⁴⁹⁾. Diese Methode ist nicht ganz korrekt, da die Tropfengröße vom spezifischen Gewicht und der Viskosität der Lösung abhängt und diese beiden Größen sich abhängig von der Saccharose-Konzentration im Gradienten ändern. So bilden z. B. 2,0 ml 45%ige Saccharose-Lösung in D-P aus einer Enzympipette auslaufend 52 ± 1 Tropfen, 2,0 ml 5%ige Saccharose-Lösung in D-P aber nur 45 ± 1 Tropfen. Weiterhin ist die Methode nicht billig, da die Zentrifugenbecher nach dem Anstechen nicht mehr zu verwenden sind. Drittens war eine Automatisierung der Gradientenelution erwünscht.

Folgende Methode wurde daher entwickelt (siehe Skizze 1 auf Seite 14): Mit einer Stativklammer wird der Ausschwingbecher mit dem Gradienten-Zentrifugenbecher in einer Colora-Kühlkiste gehalten. Eine dünne Glaskapillare wird senkrecht durch den Gradienten bis auf den Boden des Zentrifugenbechers geführt. Die Kapillare ist durch einen dünnen Schlauch mit einer LKB-Perpex-Pumpe (Getriebe 6/125), einer Quarz-Durchflußküvette ($d = 1$ cm) und einem LKB-Ultrorac-Fraktionssammler verbunden. Die Perpex-Pumpe zieht im kontinuierlichen Fluß den Gradienten von unten aus dem Zentrifugenbecher, pumpt ihn aus der Kühlkiste hinaus durch die Durchflußküvette, wieder hinein in die Kühlkiste und in die Gläschen des Fraktionssammlers. Die Durchflußküvette steht in einem Zeiss-PMQ II, das über einen Log-Lin-Wandler (Zeiss) und einem Servogor-Metrawatt-Schreiber die Absorption registriert. Bei einem Pumpenschlauch mit innerem Durchmesser von 1,1 mm werden rund 40 ml/h gefördert. Das Volumen von

der Mitte der Durchflußküvette bis zum Auslauf in den Fraktionensammler entspricht 2 Fraktionen. Die Fraktion wird jede Minute gewechselt. Der Schreiber hat einen Papiervorschub von 1 cm/Min. Das gesamte Elutionssystem wird vor Gebrauch mit der höchst konzentrierten Saccharose-Lösung luftfrei gefüllt, das Photometer auf diese Lösung eingestellt und der Schreiber justiert.

Skizze 1: Automatische Elution von Saccharose-Dichte-Gradienten:



- 1 = Ausschwingbecher mit Gradienten-Zentrifugationsbecher
- 2 = LKB-Perpex-Pumpe mit 6/125 Getriebe
- 3 = Zeiss-PMQ II mit 1 cm Durchflußküvette
- 4 = LKB-Ultrorac-Fraktionensammler
- 5 = Colora-Kühltruhe

Die Anregung zur Entwicklung dieser Methode wurde der Arbeit von O u m i und O s a w a ⁸⁵⁾ entnommen. Die Autoren drücken allerdings den Gradienten mit dosiertem Druck durch eine Injektionsnadel aus.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode werden Gradienten automatisch im kontinuierlichen Fluß eluiert, die Absorption gemessen und registriert und fraktioniert. Die Gradientenzentrifugenbecher können immer wieder benutzt werden.

Die Linearität der Saccharose-Dichte-Gradienten wurde mit einem Zeiss-Refraktometer bei Zimmer-Temperatur überprüft.

4.2 Trennung der ribosomalen Untereinheiten

Zur Trennung der Untereinheiten wurden die präparierten Roh-Ribosomen (P150) in D-P suspendiert. Sie dissoziierten innerhalb von 2 bis 3 Stunden quantitativ ¹¹⁶⁾.

Die analytischen Trennungen der ribosomalen Untereinheiten wurden mit frisch bereiteten 5-bis 40%igen Gradienten durchgeführt. Die Zentrifugationsbedingungen waren: 29 000 upm, 10 h, 4 °C, 3 x 23 Rotor, MSE 65. Die Gradienten wurden durch Anstechen der Zentrifugenbecher eluiert und in Fraktionen zu je 20 Tropfen gesammelt. Die Messung der Absorption erfolgte im Durchfluß durch eine Uvicord-Küvette mit einem inneren Durchmesser von 0,3 cm im Zeiss-PMQ II bei 260 nm. Auf den Gradienten wurden bis zu 10 OD Ribosomen aufgetragen (1 OD entspricht der Menge absorbierenden Materials, das bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 1,0 ergibt). Unter gleichen Bedingungen wurde auch die Beladbarkeit des Gradienten geprüft. Hierzu wurden 10, 60 und 120 OD aufgetragen und die Roh-Ribosomen in die Untereinheiten getrennt. Eine Messung der Verteilung der Absorption im Gradienten bei 260 nm ist aus technischen Gründen nur bis zu einer Extinktion = 2 möglich. Daher können in Gradienten mit hoher Beladung nur Bereiche mit relativ niedriger Absorption (= Flanken der Absorptionspeaks)

registriert werden. Beträgt die Schichtdicke der Durchflußküvette gar 1 cm, so wird eine Messung der Absorptionsverteilung im Gradienten bei einer Beladung über 100 OD und 260 nm nahezu unmöglich. Die Absorption in den präparativen Gradienten wurde daher später bei Wellenlängen gemessen, bei denen die Absorption der Ribosomen sehr gering ist. Dieser Wellenlängenbereich wurde zunächst empirisch ermittelt. Er kann aber auch annähernd vorherbestimmt werden nach der Formel:

$$E_{\lambda x} = \frac{E_{\lambda 260 \text{ nm}}}{OD_{260 \text{ nm}} \cdot 0,2} ,$$

wobei

$E_{\lambda 260 \text{ nm}}$ die Extinktion der Ribosomen in einem Absorptionsspektrum bei 260 nm, $OD_{260 \text{ nm}}$ die Menge des aufgetragenen Ribosomenmaterials in optischen Einheiten und $E_{\lambda x}$ die Extinktion der Ribosomen im Bereich der gesuchten Wellenlänge bedeuten. Bei dieser Wellenlänge ergibt der 50S-Peak des Gradienten bei 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von ungefähr 1.

Zur genaueren Messung der Verteilung des absorbierenden Materials im Gradienten wurde jede Fraktion in einer 0,2 cm Küvette bei 260 nm oder bei 280 nm gegen 45%ige Saccharose in D-P gemessen.

Die jeweiligen Gipfelfraktionen und die Fraktionen der abgewandten Flanken der optischen Gipfel wurden vereinigt, die Mg^{2+} -Konzentration durch 1/100 Volumen 1 M Mg-Az erhöht und die ribosomalen Untereinheiten durch Sedimentation (190 000 g, 4 °C, mindestens 9 h) gewonnen⁶⁰⁾. Die glasklaren Sedimente der Untereinheiten werden mit E-P oberflächlich abgespült und dann in E-P suspendiert. Die Ausbeute schwankt zwischen 30 und 50 %. Die 50S-Untereinheiten sind kaum, die 30S-Untereinheiten allerdings stärker mit 30S- bzw. 50S-Partikeln verunreinigt.

Die bisher beschriebenen Methoden zur Trennung der ribosomalen Untereinheiten eignen sich nicht nur für die Ribosomen aus *L. viridescens*, sondern auch aus *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis*.

5. Charakterisierung der Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

Die Konzentrationen der Ribosomen und der ribosomalen Untereinheiten werden in dieser Arbeit in optischen Einheiten angegeben. 1 OD entspricht der Menge absorbierenden Materials, das bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 1,0 ergibt. Die Messungen hierzu wurden mit 100- bis 500fach verdünnten Ribosomen-Lösungen im Zeiss PMQ II gegen den jeweiligen Lösungspuffer durchgeführt.

Nach ¹¹⁶⁾ entsprechen 1 mg Ribosomen/0,1 ml einer Extinktion $E_{260 \text{ nm}, 1 \text{ cm}}^1 = 150$. Diese Beziehung gilt für Ribosomen aus *E. coli* und wurde auch für *L. viridescens* angenommen ⁴⁹⁾. Trockengewichtsbestimmungen nach ¹¹⁶⁾ unterstützen die Richtigkeit dieser Annahme. Das gilt aber sehr wahrscheinlich nur für Ribosomen mit einer bestimmten Konformation und mit einem bestimmten RNA/Protein-Verhältnis. So nimmt der Extinktionskoeffizient reiner ribosomaler RNA um mehr als 25 % ab, wenn sie mit ribosomalem Protein den ribosomalen Komplex gebildet hat ^{63, 91, 97)}. Dieser hypochrome Effekt ist aber nicht konstant für Ribosomen der gleichen Art, die bei unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen vorliegen, da durch Auffaltung der Ribosomen bei niedriger Mg^{2+} -Konzentration ^{29, 32)} die Absorption der ribosomalen RNA wieder mehr zur Geltung kommen kann und der Extinktionskoeffizient steigt. So sind die Konzentrationsbestimmungen durch optische Messungen bei 260 nm nur bei gleicher Ionenkonzentration vergleichbar.

Ebenso ist es nicht möglich, spektroskopisch den RNA- und (oder) den Protein-Gehalt der Ribosomen zu bestimmen. Groves et al. ³⁶⁾ beschreiben zwar eine Methode, diese ist aber nur für Bestimmungen der Proteine zu gebrauchen,

die nicht an RNA gebunden sind aus oben genannten Gründen. Schließlich werden in der älteren Literatur immer wieder die Verhältnisse der Extinktionen bei 280, 260 und 235 nm angegeben. Diese Verhältnisse sind aber durch die Variabilität des hypochromen Effektes und der Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung mit Vorsicht anzuwenden. In dieser Arbeit wird zunächst angenommen, daß bei einem Extinktionsverhältnis $E_{260 \text{ nm}} : E_{280 \text{ nm}} \simeq 1,9$ das Verhältnis RNA : Protein $\simeq 1,5$ ist (49, 71, 116).

Die Absorptionsspektren der einzelnen Präparationsschritte zwischen 310 und 220 nm wurden mit den Spektral-Photometern von Beckmann (DK II) und Gilford (2400) aufgenommen.

Mit Hilfe von Herrn Dipl.Phys. J. F e y wurden die Sedimentationskonstanten der Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten aus Optimal-Zellen in der analytischen Ultrazentrifuge Beckmann Modell E ermittelt. Die Standardlaufbedingungen waren: 44 770 upm, 20 °C, 12 mm Kel-F-Zelle, Schlierenoptik und teilweise gleichzeitig UV-Optik, Aufnahmen automatisch alle 4 Min. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Zeiss-Meßmikroskop. Die S-Werte wurden mit einem Standard-Rechenprogramm in der Diel-Combitron-S ermittelt. Zur Konzentrationsextrapolation der gefundenen S-Werte auf Konzentration = 0 diente die Eichkurve von E m m e r i c h ³⁰⁾, die für *B. subtilis* bestimmt wurde.

Eine S-Wertbestimmung im Saccharose-Dichte-Gradienten ist nach S p i r i n et al. ¹⁰⁶⁾ ebenfalls möglich, wenn man annimmt, daß die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel im Gradienten konstant ist. Dann verhalten sich die Sedimentationsstrecken der Partikel wie ihre S-Werte. Die Autoren benutzten 50S-Untereinheiten von *E. coli* Ribosomen als Marker und erhielten gute Ergebnisse zwischen 30S und 70S.

6. Präparation der ribosomalen Proteine

Durch hohe Salzkonzentration oder (und) niedrigen pH werden die ribosomalen Proteine von der ribosomalen RNA abgelöst und gelöst, während die RNA ausfällt und durch Sedimentation abgetrennt werden kann⁵⁷⁾.

Die Ablösung der ribosomalen Proteine und Fällung der ribosomalen RNA nach S p i t n i k - E l s o n¹⁰⁷⁾ mit 3 M LiCl und 4 M Harnstoff brachte bei Ribosomen aus *L. viridescens* keinen Erfolg: auch nach 48 h Inkubation der Ribosomensuspension war keine Trübung durch gefällte RNA zu erkennen, und die Ribosomen konnten als glasklares Pellet resedimentiert werden. Ribosomen aus verschiedenen Bakterienarten verhalten sich offensichtlich unterschiedlich gegen diese LiCl-Harnstoff-Behandlung. So ist bei *Streptococcus faecalis* eine Inkubation über 10 Tage und eine zusätzliche Ribonuclease-Verdauung notwendig, um die ribosomalen Proteine von der ribosomalen RNA abzulösen¹³³⁾. Mit dieser Methode sind *E. coli* Ribosomen hingegen innerhalb 48 h in ribosomale Proteine und RNA zu trennen⁵⁷⁾.

Die beste Methode der Ablösung der ribosomalen Proteine von der ribosomalen RNA ist die Behandlung der Ribosomen mit 66%iger Essigsäure nach W a l l e r¹²¹⁾, modifiziert nach H a r d y et al.⁴⁰⁾. Mit dieser Methode werden bei *E. coli* die meisten ribosomalen Proteine mit der größten Ausbeute gewonnen⁵⁷⁾.

Zur Suspension der Ribosomen oder ribosomalen Untereinheiten mit 200 bis 500 OD/ml werden 1/10 Volumen 1 M $MgCl_2$ gegeben. Die Suspension wird in der Kälte ständig gerührt. Dann wird gleich das 2fache Volumen Eisessig tropfenweise hinzugefügt und 45 Min unter ständigem Rühren inkubiert. Nach Abtrennung der gefällten RNA (20 000 g, 20 Min) und Waschen des Nieder-

schlags unter gleichen Bedingungen werden die klaren Überstände vereinigt und gefriergetrocknet⁵⁵⁾. Die getrockneten ribosomalen Proteine und Salze werden in wenig Wasser gelöst bzw. suspendiert (ribosomale Proteine sind in Wasser unlöslich) und intensiv gegen Wasser dialysiert. Die Dialyseschläuche (Wisking, 1 cm) waren 3 Tage in 4 mM EDTA bei 70 °C gequollen. Die Dialyse wurde über mindestens 1 1/2 Tage mit 3maligem Wechsel und je 500fachem Volumen bei 4 °C durchgeführt. Die salzfreie Suspension der ribosomalen Proteine wird zum zweitenmal gefriergetrocknet und die Proteine anschließend gewogen und verschlossen im Kühlschrank aufgehoben.

Andere Methoden, die ribosomalen Proteine nach Essigsäurefällung der ribosomalen RNA salzfrei zu bekommen, schlugen leider fehl. So gelang eine Ammonsulfatfällung aus der 66%igen Essigsäure, anschließende Lösung der Proteine in 8 M Harnstoff und Entsalzung über Sephadex nicht. Es schien jedoch wünschenswert, die Gefrieretrocknung der ribosomalen Proteine zu umgehen, da lyophilisierte ribosomale Proteine in hohem Maße im Start der Elektrophorese liegenbleiben sollen. Hingegen sollen Proben, die durch Umdialyse aus der Essigsäure in das Substanzgel (siehe unten) gebracht sind, in höherem Maße löslich bleiben und weniger aggregieren⁵⁵⁾. Daher wurde die Essigsäurelösung der ribosomalen Proteine mit Harnstoff (2,5 molar) und Acrylamid (1,3 %) versetzt und am Rotationsverdampfer bei 30 °C auf 1/3 Volumen eingeeengt, ohne daß die Proteine ausfielen. Die Proben wurden dann gegen 3 Wechsel Substanzgel intensiv bei Zimmer-Temperatur dialysiert, bis der pH-Wert der Probe gleich dem des Substanzgels war. Die Elektrophorese zeigte leider kein gutes Ergebnis: in der ersten Dimension konzentrierten die Proteinbanden nicht. Sie wanderten außerdem allgemein weiter zur Anode. Das gleiche Bild erhält man, wenn gefriergetrocknete ribosomale Proteine im Substanzgel gelöst längere Zeit (mehr als 1 Tag) bei 10 °C aufgehoben werden. Diese Beobachtungen beschreiben auch Shaw und Armstrong¹⁰²⁾. Es wurden daher die gefriergetrockneten Proteine direkt vor Beginn der Elektrophorese im Substanzgel gelöst.

7. Analyse der ribosomalen RNA

Die bei der Präparation der ribosomalen Proteine ausfallende ribosomale RNA wurde nach einem Verfahren, das Herr Med. Ass. R. V e r h a g e n entwickelt hatte, in 95%igem Äthanol zweimal gewaschen und mit Äther getrocknet. Die trockenen RNA-Präparate werden in 0,05 M Tris gelöst (in der Kälte) und Proben zur optischen Messung oder Elektrophorese entnommen.

Herr Verhagen führte auch eine elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen RNA-Präparate der drei untersuchten Wachstumsphasen aus. In einem Gelsystem (2,4 % Acrylamid mit 0,5 % Agarose und 10 % Acrylamid) konnte er die 23S-, 16S-, 5S- und 4S-RNA trennen. Die Gele wurden mit Methylenblau gefärbt.

Zur Identifizierung und Unterscheidung zwischen Protein und RNA in den elektrophoretischen Mustern der ribosomalen RNA wurden die Gele wieder entfärbt und die fixierten Banden nach D a h l b e r g et al.¹⁸⁾ mit „stains all“ (= 4,5,4',5'-Dibenzo-3,3'-diäthyl-9-methyl-thiacarbo-cyaninbromid, SERVA) neu gefärbt.

8. Acrylamidgel-Elektrophorese der ribosomalen Proteine

Die von K a l t s c h m i d t und W i t t m a n n ⁵²⁾ entwickelte zweidimensionale Acrylamidgel-Elektrophorese (= 2DE) wurde zur Analyse der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* übernommen und etwas modifiziert.

8.1 Elektrophorese in der ersten Dimension (= 1D)

Die erste Dimension wurde zunächst standardisiert. Eine Elektrophorese bei Zimmer-Temperatur benötigt zwar weniger Zeit, birgt aber die Gefahr, daß die Banden von Versuch zu Versuch verschieden weit wandern. Eine Markierung einer Pufferfront mit verschiedenen bei Gel-Elektrophoresen gebräuchlichen Farbstoffen gelang leider nicht.

Die Glasröhrchen der 1D (21 cm Länge, 7 mm bzw. 5 mm innerer Durchmesser, Duran-Glas) werden mit durchbohrten Gummistopfen in Bohrungen eines oberen Pufferbeckens eingehängt und reichen mit dem unteren Ende in ein zweites Pufferbecken. Die Becken sind aus Frischhaltedosen (Kaufhof) gefertigt und an einem Stativ befestigt. Ihre Höhe zueinander ist variabel. Im Deckel der oberen und im Boden der unteren Dose sind Platinelektroden eingelassen. Beide Dosen tragen an der Seite einen Auslauf. Die Apparatur wurde nach einer Idee von Herrn Dr. H.J. A s c h h o f f gebaut.

Die Zusammensetzung der Gele und des Elektrodenpuffers für die 1D war folgende (Addendum der Originalarbeit ⁵²⁾) :

Substanz-Gel (= SG): Borsäure 5,17 mM, EDTA-Na₂ 2,15 mM,
Tris 40 mM, Acrylamid 0,562 M = 4 %,
Bisacrylamid 6,5 mM = 0,1 %, TEMED
0,06 ml/100 ml, Harnstoff 8 M, pH 8,9.

Trenn-Gel (= TG): Borsäure 51,7 mM, EDTA-Na₂ 21,5 mM,
Tris 0,4 M, Acrylamid 0,562 M = 4 %,
Bisacrylamid 13 mM = 0,2 %, TEMED
0,3 ml/100 ml, Harnstoff 6 M, pH 8,6.

Elektroden-Puffer
(= 1DP): Borsäure 0,155 M, EDTA-Na₂ 65 mM,
Tris 0,12 M, Harnstoff 6 M, pH 8,6.

Der 1DP kann auch ohne Harnstoff mit gleichem Erfolg benutzt werden¹⁰⁹⁾. Beide Gele werden vor der Polymerisation 1/2 h durch Vakuum entgast⁹⁰⁾.

Die Polymerisation des TG erfolgt durch 1 Volumen 7%iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung in H₂O auf 99 Volumen TG in der Kälte in 1/2 h. Die Polymerisation des SG wurde zunächst mit Riboflavin und Peroxodisulfat durchgeführt. Doch wird das Auswandern der ribosomalen Proteine aus dem SG offensichtlich durch die Chemokatalyse behindert, da die Polymerisation zu schnell erfolgt und die Poren des SG zu eng werden. So sind bei dieser Methode relativ große Mengen Protein nötig, um deutliche Flecken zu erhalten. Daher wurde die Katalyse der Polymerisation geändert. 1 Volumen SG wird mit 1/200 Volumen frischer 0,05%iger Riboflavin-Lösung gemischt und nach Einbringen in die Glasröhrchen mit einer Osram-L-Lampe (16 W/32 U) bestrahlt. Nach 1 h ist das SG dann meist fest. Diese Methode geht aber nur, wenn das SG nicht zu hohe Proteinkonzentrationen enthält. Bewährt haben sich 2 bis 4 mg in 0,2 bis 0,4 ml SG für die 7 mm dicken Gele und 0,5 bis 2 mg Protein in 0,05 bis 0,1 ml SG für die 5 mm Gele. Eine noch bessere Methode wurde in dieser Arbeit noch nicht angewandt, soll aber erwähnt werden. Die ribosomalen Proteine werden in einer Lösung gelöst, die alle Salze des SG und statt der Gelkomponenten (Acrylamid, Bisacrylamid und TEMED) 1 M Glucose enthält. Die viskose Lösung kann mit TG gut überschichtet werden.

In den Glasröhrchen werden nacheinander polymerisiert: 10 cm TG, SG mit gelöstem Proteingemisch, 9,5 bis 10 cm TG. Die Gesamtlänge des Gelsystems ist 20,5 cm. Jedes Gel wird, nachdem es in die Glasröhrchen gegossen ist, mit 4 M Harnstoff überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation durch Luft-O₂ zu verhindern^{12, 90}). Der Harnstoff wird mit Saugpapier entfernt, bevor das nächste Gel aufpolymerisiert wird.

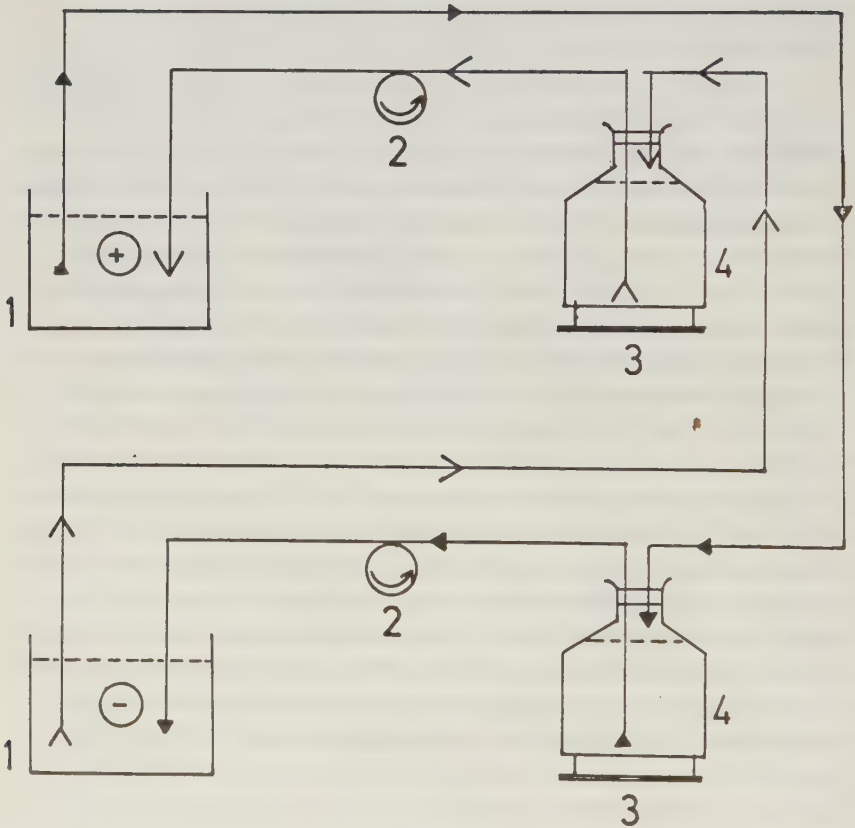
Mit ribosomalem Protein aus *E. coli* (freundlicherweise von Herrn Dr. E. Kaltschmidt, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, zur Verfügung gestellt) und aus *L. viridescens* wurden Standardisierungsläufe der 1D in einer Colora-Kühlkiste bei 10 °C und 90 Volt durchgeführt. Die Laufstrecke der am schnellsten wandernden Proteinbanden wurden gegen die Elektrophorese-Zeit aufgetragen. Da eine lineare Abhängigkeit festzustellen war, konnte die Laufzeit für ribosomale Proteine aus *L. viridescens* ermittelt werden.

§

Um Pufferwechsel zu vermeiden und die Ionenkonzentration in den Pufferbecken konstant zu halten^{24, 86}), wurde ein automatischer Pufferumlauf entwickelt (Skizze 2). Durch 2 Perpex-Pumpen mit gleichem Getriebe wird der Elektrodenpuffer aus dem einen Elektrodenbecken durch eine Mischflasche in das andere Becken gepumpt. Die Pumpgeschwindigkeit beträgt rund 50 ml/h. Durch den gekreuzten Pufferumlauf braucht auch während einer 40stündigen Elektrophorese kein Pufferwechsel vorgenommen zu werden. Die Gesamtpuffermenge in Elektrodenbecken und Mischflaschen umfaßt 10 l.

- Skizze 2 siehe nächste Seite -

Skizze 2: Automatischer Pufferumlauf für Langzeit-Elektrophoresen



- 1 = Elektroden-Pufferbecken
- 2 = Perpex-Pumpen mit gleichem Getriebe
- 3 = Rührmotor
- 4 = Mischflasche

Trotz des Pufferumlaufs ist zu beobachten, daß die Stromstärke während einer 40stündigen Elektrophorese um $\frac{1}{3}$ absinkt. Der gleiche Effekt ergab sich auch in der 2. Dimension. Gleiche Beobachtungen beschreiben De launay und Schapira²⁴⁾; eine Erklärung ließ sich dafür jedoch nicht finden.

Die Entfernung der Gele der 1D aus den Glasröhrchen gelingt am besten, wenn die Gele über 10 bis 15 Min in Eiswasser schrumpfen und dann vorsichtig mit dosiertem Wasserdruck herausgepreßt werden.

Die Proteinbanden in den Gelstäbchen werden mit 0,5%iger Amidoschwarz-Lösung in 7%iger Essigsäure über rund 1 h gefärbt. Sie werden sichtbar, nachdem der Hintergrund durch mehrere Wechsel 7%iger Essigsäure farblos geworden ist. Eine Färbung der Proteine mit Coomassie-Blue wurde als Vergleich durchgeführt, brachte bei den ribosomalen Proteinen aus *L. viridescens* aber kein anderes Ergebnis.

Die Verteilung der Proteinbanden im Gel wurde mit einem Kipp Zonen Densitometer DD2 und einem Mikrograph BD5 bei 580 bis 650 nm als Transmissionen gemessen und registriert. Außerdem wurden einige Gele mit einer Asahi-Spotmatic II, Objektiv 1 : 1,8, 50 mm Brennweite auf Kodak, High Speed, Ektachrome EHB 135 - 20 photographiert. Die Gele lagen hierzu auf einer Mattscheibe über einem Leuchtkasten mit Osram-L-Glühröhren. Belichtungszeit war $\frac{1}{30}$ und die Blende 11.

Waren die ribosomalen Proteine während der Restaurationsphase mit radioaktiven Aminosäuren markiert, so wurden eindimensionale Gele mit Rasierklingen in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und die Aktivität eluiert und gezählt (siehe unten).

In der Originalarbeit⁵²⁾ werden die Gelstäbchen der ersten Dimension durch eine Dialyse auf die zweite Dimension vorbereitet. Der Dialyse-Puffer:

Harnstoff 8 M, KOH 12 mM, mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt, wird in drei Wechsel (je 1 l Puffer auf 5 Gele) für je 30 Min bei Zimmer-Temperatur gerührt. Nach Rücksprache mit Frau Dipl.Biol. E. D e u s s e r (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) wurde später die Dialyse nicht mehr durchgeführt, sondern die Gele der ersten Dimension gleich als Substanz-Gele in die zweite Dimension eingesetzt. Diese Methode bietet den Vorteil, daß kein Protein zwischen den einzelnen Elektrophoreseschritten aus dem Gel diffundiert.

8.2 Elektrophorese in der zweiten Dimension (= 2D)

Die Apparatur für die 2D der Elektrophorese der ribosomalen Proteine⁵²⁾ wurde in der Werkstatt des Instituts von Herrn W i r t h nach Originalplänen von Herrn Dr. E. K a l t s c h m i d t mit seiner Erlaubnis nachgebaut. Als Verbesserung wurden nachträglich die Plexiglasplatten, zwischen denen die Gelplatten der 2D gegossen werden, von außen durch Plexiglasstege versteift. Damit wird verhindert, daß sich die Plexiglasplatten verformen, wenn die Gele hohe Polymerisationswärme erzeugen. Durch diese Veränderung lassen sich die Gelplatten leichter reproduzieren.

In der Apparatur der 2D können 5 Platten gleichzeitig gegossen werden. Als Trenngel dient:

Trenn-Gel (= TG): Harnstoff 6 M, KOH 0,05 M, Acrylamid 18 %, Bisacrylamid 0,5 %, TEMED 5,8 ml/l, mit Eisessig auf pH 4,6 eingestellt.

Das Gel wird durch Einleiten von N_2 (30 Min) und im Vakuum (30 Min) entgast. Die Polymerisation der Abschlußplatte erfolgt mit 1 Volumen 10%iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung auf 29 Volumen TG im Kühlraum bei 4 °C ohne Überschichtung des Gels. Dann werden 29 Volumen TG mit 1 Volumen 5%iger Ammoniumperoxodisulfat-Lösung gemischt und unter die Gelstäbchen der 1D zwischen die Plexiglasplatten gegossen. Die Polymerisation beginnt bei Zimmer-Temperatur und wird im Kühlraum vollendet (rund 3 h). Die Elektrophorese erfolgt mit 20 l Elektroden-Puffer (= 2DP): Glycin 14 %, Essigsäure 1,5 %, pH 3,9

im gekreuzten Pufferumlauf (70 ml/h) bei 120 V und 400 mA im Anfang. Der Puffer ist vor der Elektrophorese auf 5 °C gekühlt und wird durch die Wärmeentwicklung während der Elektrophorese auf über 30 °C erwärmt. Die Elektrophorese in der 2D läßt sich an den lichtbrechenden Linien der Pufferfront in den Gelplatten verfolgen und dauert mindestens 33 h.

Nachdem die Verschraubung des Plexiglasblockes gelöst ist und die Gelplatten vorsichtig von den Segmenten abgehoben sind, werden die recht steifen Gele in 0,5%iger Amidoschwarz-Lösung in 7%iger Essigsäure 1 h gefärbt. Nach mindestens 7 Entfärbebädern in 7%iger Essigsäure werden die blauen Flecken der ribosomalen Proteine sichtbar.

Auf die entfärbten Gelplatten wurden Klarsichtfolien gelegt und das Muster der Flecken direkt abgezeichnet. Die Technik der Gel-Photographie bitte ich oben nachzulesen. Die Gelplatten können in Haushaltsfolie eingeschlagen über Monate im Kühlraum aufgehoben werden, ohne daß ein Verlust der Farbintensität der Flecken zu beobachten ist.

Die abgezeichneten Muster der ribosomalen Proteine wurden untereinander verglichen. Jeder Fleck erhielt eine Positionsziffer. Die relativen Positionen der Proteine wurden vermerkt

und in Tabellen zusammengestellt. Vergleiche der Muster von 70S-, 50S- und 30S-ribosomalem Protein aus *L. viridescens* machten es möglich, die einzelnen ribosomalen Proteine auf gleiche Weise zu bezeichnen, wie es für ribosomale Proteine aus *E. coli* vorgeschlagen⁵⁵⁾ und für 30S-ribosomale Proteine in vielen Arbeitsgruppen praktiziert wird¹²⁵⁾.

Bei Versuchen mit ribosomalen Proteinen, die während der Restaurations-Phase mit radioaktiven Aminosäuren markiert worden waren, wurden die Flecken der Gelplatten der 2D mit einem Korkbohrer (5 mm Durchmesser) ausgestochen und die Aktivität eluiert und gezählt (siehe unten).

9. Bestimmung der Radioaktivität

Nach Inkubation der Zellen in der Restaurations-Phase mit radiomarkierten Aminosäuren wurden verschiedene Proben auf ihre Aktivität im Packard-Tricarb Scintillationszähler in 12 ml Scintillatorcocktail geprüft. Den einzelnen Präparationsstufen wurden Proben von 10 μ l entnommen und in 12 ml Bray-Scintillator gelöst. Dämpfungen der Zählraten wurden hier nicht berücksichtigt.

Ribosomen der Restaurations-Phase wurden über Saccharose-Dichte-Gradienten in Untereinheiten getrennt. Die Verteilung der Radioaktivität in den Gradienten wurde gemessen in je 0,5 ml jeder Fraktion des Gradienten⁹³⁾. Zur Prüfung des Lösch-Effektes der unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen auf die Zählausbeute wurden je 0,5 ml der Saccharose-Lösungen, aus denen die Gradienten bereitet waren, mit inneren Standards aus ^3H - und ^{14}C -Leucin versetzt und in 12 ml Bray-Scintillator gezählt.

Die Verteilung der Radioaktivität in Gelen der 1D und 2D wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden einige in der Literatur angegebene Methoden zur Lösung der Gele erprobt. So konnte die Methode von Anker¹⁾ leider nicht reproduziert werden. Der Ersatz von Bisacrylamid durch Dimethylamino-propionitril (Serva) verursachte ein Gel mit anderer Porenweite. Die Proteinflecken der 2. Dimension waren kaum mit dem Muster der oben beschriebenen Gele zu vergleichen. Mit 2%iger Jodsäure waren Stücke eines solchen Gels auch nach Tagen nicht in Lösung zu bringen.

Sowohl Acrylamidgele als auch verschiedene Lösungsmittel vermindern die Zählausbeute in Toluolscintillatoren erheblich. Um die beste Methode zur Elution der Radioaktivität

aus den Gelstücken zu finden, wurde folgender Versuch angesetzt:

^{14}C -markiertes Polypeptidgemisch, das Frau Dipl.Biol. M. F e y mit Poly-U/Poly- ^{14}C -Phe im E. coli-System hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte, wurde in 1D-TG und 2D-TG einpolymerisiert. Die Gele wurden dann in gleich große Stücke, wie in den späteren Versuchen, zerschnitten und verschiedenen Elutionsmethoden ausgesetzt. Dabei gelangten folgende Elutionsmethoden zur Anwendung:

1. Inkubation mit Soluene bei verschiedenen Temperaturen³¹⁾
2. Lösen des Gels mit NH_4OH und Soluene¹⁶⁾
3. Inkubation mit H_2O_2 und Soluene⁵¹⁾ und
4. Lösen des Gels mit Dimethylsulfoxid.

Nach der Elution wurden die Proben in Toluolszintillatoren gezählt. Die höchste Zählausbeute wurde mit Soluene (12 h, 60 °C) gefunden.

10. Aminosäureanalyse der 70S-ribosomalen Proteine

Mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. L. G ü r t l e r wurden Aminosäureanalysen der Gemische der ribosomalen Proteine von 70S-ribosomalen Proteinen der untersuchten Wachstumsphasen mit dem Aminosäuren Analysator BC 200 durchgeführt³⁷⁾. Die Angaben der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind in Mol% angegeben und wurden aus 24- und 72stündigen Hydrolysaten bestimmt.

C. Ergebnisse

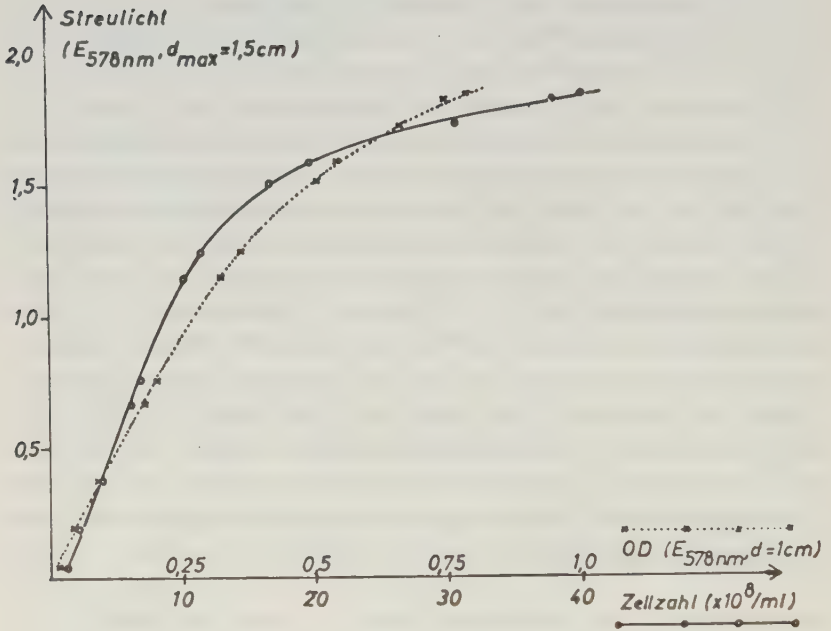
1. Untersuchungen an Ribosomen aus Zellen, gewachsen bei Thiamin-Sättigung (Optimal-Zellen)

1.1 Wachstum von *Lactobacillus viridescens*

Das Wachstum der Zellkulturen wurde durch Messen des Streulichtes der Kulturen in Zuchtgläsern bei 578 nm kontrolliert. Es war daher das Verhältnis zwischen Streulicht, optischer Dichte (= OD) und Zellzahl/ml zu untersuchen. Aus drei Parallel-Züchtungen von *L. viridescens* in APT-Medien (= optimales Wachstum) wurden jede Stunde je 2 Proben für Doppelbestimmungen entnommen und die Bestimmungen sofort durchgeführt. Die Meßwerte sind gemittelt (Abbildung 1). Eine lineare Abhängigkeit zwischen zwei Meßgrößen konnte in keinem Fall festgestellt werden. Durch diesen Versuch war die Möglichkeit gegeben, von Streulichtmessungen auf OD-Werte oder Zellzahl/ml der Kulturen zu schließen.

Die verschiedenen Wachstumsphasen, in denen die Keime geerntet wurden, sind in Abbildung 2 dargestellt. Als Vergleich dienten Zellen, die im APT-Medium bei optimaler Thiaminkonzentration bis zu einer Streulicht-Dichte von 1,5 (entsprechend $OD = 0,5$, Zellzahl/ml = 17×10^8) gewachsen waren. Diese Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und eingefroren. Mangel-Zellen waren mindestens 14 h in Thiamin-freiem TAM-Medium gehalten. Restaurationszellen entstammen der „Lag“-Phase. Diese Phase dauert 1 bis 1 1/2 h nach Zugabe von 100 ng Thiamin/ml zu Mangelkulturen und bezeichnet den Zeitraum, in dem sich die Zellen noch nicht teilen.

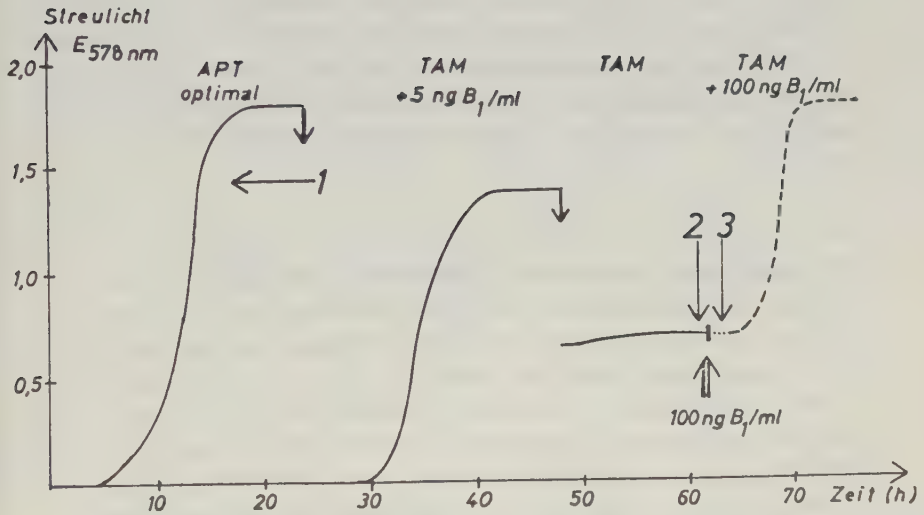
Abbildung 1: Abhängigkeit der Zellzahl/ml und der optischen Dichte vom Streulicht in *L. viridescens*-Kulturen



Aus drei Parallelzuchtungen von *L. viridescens* in APT-Medien bei 30 °C wurden jede Stunde Doppelproben entnommen und Streulicht (578 nm) in Zuchtgläsern, optische Dichte (OD, 578 nm) in 1 cm-Küvetten und Zellzahl/ml bestimmt. Die Meßwerte wurden gemittelt.

Bei den Versuchen zu dieser Arbeit wurden die Restaurations-Zellen stets nach 30 bis 45 Min „Lag“-Phase geerntet.

Abbildung 2: Thiaminabhängige Wachstumsphasen von *Lactobacillus viridescens*



1 = *L. viridescens* Ende der logarithmischen Wachstumsphase = Optimal-Zellen

2 = *L. viridescens* nach 14 h Thiamin-Hunger = Mangel-Zellen

3 = *L. viridescens* nach 14 h Thiamin-Mangel mit 100 ng Thiamin/ml 30 bis 45 Min inkubiert = Restaurations-Zellen

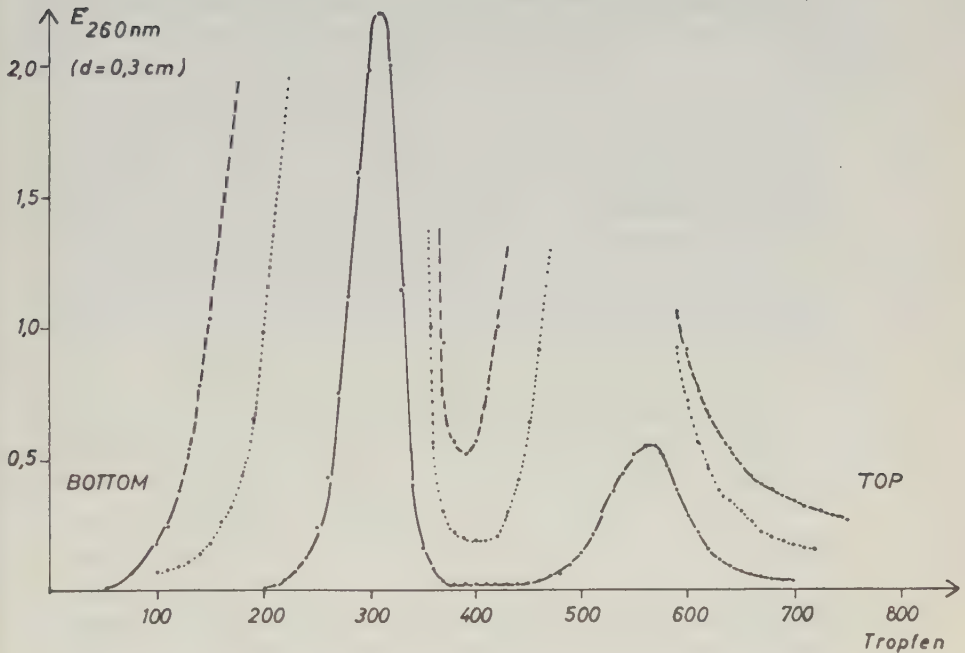
B_1 = Thiamin

1.2 Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und ribosomalen Proteinen

Aus einem Liter APT-Medium können in der Regel 1,5 g Bakterienzellen (Feuchtgewicht) geerntet werden. 1 g Bakterien liefern rund 180 OD Roh-Ribosomen und rund 130 OD gereinigte 70S-Ribosomen entsprechend 8,7 mg; aus diesen 130 OD 70S-Ribosomen können 2,9 mg ribosomales Protein präpariert werden. Das entspricht einem Proteingehalt der Ribosomen von 33 %.

Die ribosomalen Untereinheiten wurden aus den 70S-Roh-Ribosomen durch Dissoziation bei niedriger Mg^{2+} -Konzentration und Trennung in Saccharose-Dichtegradienten gewonnen. Die Beladbarkeit von 5 bis 40%igen Saccharose-Dichtegradienten zeigt Abbildung 3. Die unmittelbar vor Gebrauch gemischten Gradienten⁸⁾ wurden mit 10, 60 und 120 OD dissoziierten Ribosomen beladen und 10 h bei 29 000 upm und 4 °C zentrifugiert. Nach Anstechen der Zentrifugenbecher wurden die Gradienten bei 260 nm gemessen und in Fraktionen zu je 20 Tropfen aufgefangen. Selbst bei einer Beladung über 150 OD in bis zu 0,6 ml D-P wurde eine Trennung der Untereinheiten erreicht. Bei späteren präparativen Trennungen wurden bis zu 10 9- bis 45- bzw. 13- bis 45%ige Gradienten mit je 150 OD ribosomalem Material beladen und bei 29 000 upm, 4 °C über 14 bis 16 Stunden zentrifugiert. Die Elution, Messung und Fraktionierung der Gradienten wurde dann mit der im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen automatischen Methode (Skizze 1) durchgeführt. Die Gipfelfraktionen und die Fraktionen der abgewandten Flanken der 50S- und 30S-Gipfel wurden gesammelt und die Untereinheiten durch Sedimentation gewonnen.

Abbildung 3: Beladbarkeit eines 5 bis 40%igen Saccharose-Gradienten



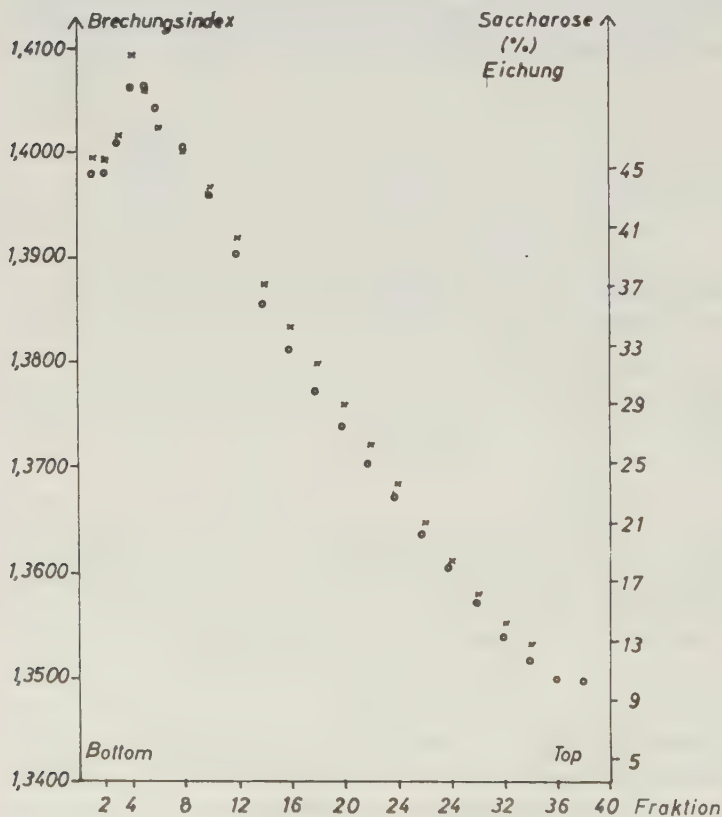
Drei 5 bis 40%ige Saccharose-Dichtegradienten wurden mit unterschiedlichen Mengen dissoziierter Ribosomen beladen und im gleichen Rotor 10 h bei 29 000 upm und 4 °C zentrifugiert. Die Verteilung der Absorption der ribosomalen Untereinheiten wurde bei 260 nm gemessen.

10 OD = ————— 60 OD = 120 OD = - - - - -

Die Ausbeute betrug etwa 40 %. Die Gradienten waren durch Überschichten und Einfrieren hergestellt¹⁰³⁾ und wurden auf Linearität und Reproduzierbarkeit geprüft. Die Abbildung 4 zeigt die Meßergebnisse zweier Gradienten, die nach Zentrifugation und automatischer Elution refraktometriert

wurden. Die beiden Kurven sind repräsentativ für 6 ausgemessene Gradienten, von denen 3 zentrifugiert und die anderen nach dem Auftauen gleich fraktioniert waren. Es wurden bei gleichen Gradiententypen gleiche Kurven gemessen, unabhängig ob der Gradient zentrifugiert war oder nicht.

Abbildung 4: Refraktometer-Messung von Saccharose-Dichtegradienten



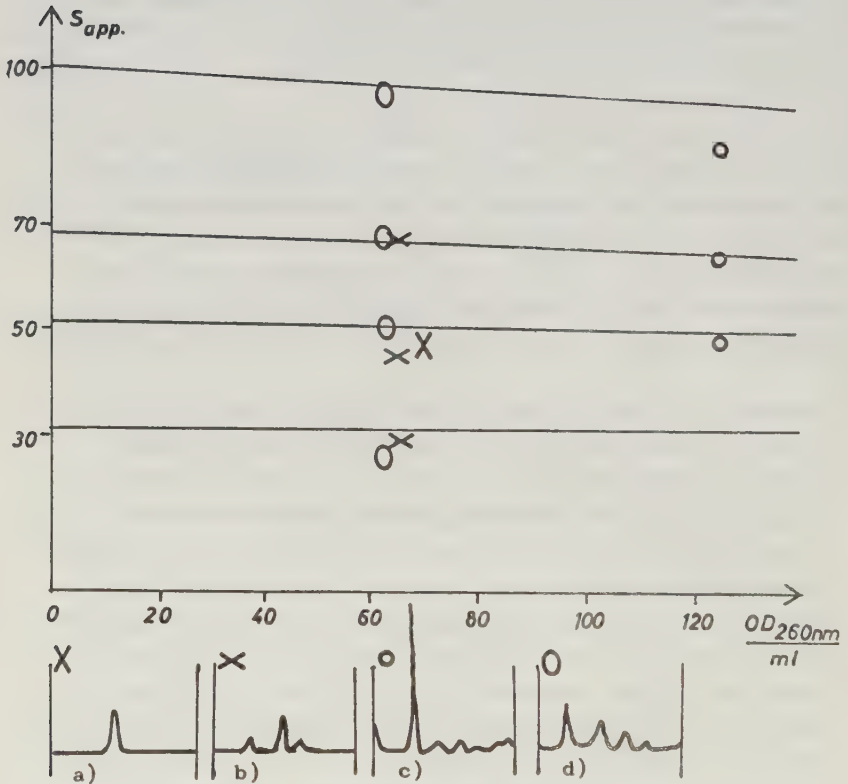
Zentrifugierte 9 bis 45%ige ●●● und 13 bis 45%ige xxx Saccharose-Dichtegradienten, bereitet nach 103), wurden automatisch eluiert und fraktioniert und die Dichte der Fraktionen im Refraktometer gemessen. Die rechte Skala ist mit den Saccharose-Lösungen geeicht, aus denen die Gradienten hergestellt wurden.

Analytische Trennungen der ribosomalen Untereinheiten (z. B. in Abbildung 3 mit 10 OD) ergaben stets zwei optische Gipfel, deren Flächen sich wie 2 : 1 verhielten. Der größere Gipfel beschreibt das 50S-, der kleinere das 30S-Material. Die Sedimentationsstrecken der beiden Untereinheiten verhalten sich annähernd wie 1,4.

Die Analyse der präparierten ribosomalen Untereinheiten in der analytischen Ultrazentrifuge bringt Aufschluß über die Sauberkeit der Trennung und das getrennte Material. Außerdem konnte noch geprüft werden, ob Ribosomen, die längere Zeit bei 3×10^{-4} M Mg^{2+} dissoziiert waren, nach Reassoziatio n zu 70S-Ribosomen veränderte Sedimentationskonstanten zeigten. Abbildung 5 bringt folgende Ergebnisse:

1. Präparierte 50S-Untereinheiten zeigen einen einzigen symmetrischen Gipfel mit einem S-Wert von 49 (extrapoliert auf Konzentration = 0). Die 50S-Untereinheiten sind also nach der Trennung durch Saccharose-Dichtezentrifugation nicht mit 30S-Untereinheiten verunreinigt (Abb. 5a).
2. Präparierte 30S-Untereinheiten weisen in der analytischen Ultrazentrifuge bei 10^{-2} M Mg^{2+} drei Gipfel auf (Abbildung 5b). Diese sedimentieren mit 29,5S, 45,5S und 69S. Der erste Gipfel repräsentiert offensichtlich 30S-Untereinheiten. Den zweiten Gipfel mit rund 60 % des sedimentierenden Materials müssen 30S-Dimere hervorrufen, da sonst im elektrophoretischen Muster der 30S-ribosomalen Proteine bevorzugt 50S-ribosomale Proteine gefunden würden, was aber nicht der Fall ist (siehe unten). Ein geringer Hintergrund von 50S-ribosomalen Proteinen, der in den Gelplatten zu sehen ist, stammt aus Verunreinigungen der Präparation der 30S-Untereinheiten mit 50S-Partikeln, die bei 10^{-2} M Mg^{2+} mit 30S-Untereinheiten zu 70S-Ribosomen aggregieren und den dritten Gipfel bilden.

Abbildung 5: Analyse der Sedimentation der präparierten ribosomalen Untereinheiten und reassozierten Ribosomen



- a) durch Gradientenzentrifugation präparierte 50S-Untereinheiten; $S_{app} = 49$
- b) durch Gradientenzentrifugation präparierte 30S-Untereinheiten, $S_{app} = 29,5, 45,5, 69$
- c) 4 h dissoziierte und 14 h reassozierte 70S-Ribosomen $S_{app} = 92, 68, 50$
- d) 20 h dissoziierte und getrennte und reassozierte 70S-Ribosomen; $S_{app} = 100, 70, 50, 28$

Alle Proben wurden bei $10^{-2} M Mg^{2+}$ in D-P zentrifugiert.

3. 70S-Ribosomen (Roh-Ribosomen) dissoziierten 4 h in D-P. Dann wurde die Mg^{2+} -Konzentration wieder auf $10^{-2}M$ erhöht, 14 h in der Kälte zur Reaggregation inkubiert und das Sedimentationsverhalten der ribosomalen Partikel untersucht. Abbildung 5c zeigt, daß der Hauptanteil des Materials zu 70S-Dimeren assoziiert ist und mit annähernd 100S sedimentiert. Die beiden kleinen folgenden Gipfel zeigen 68S und 50S. Eine Dissoziation in die Untereinheiten und Reassoziierung der 70S-Ribosomen ändert also nicht das Sedimentationsverhalten der Ribosomen aus *L. viridescens*.
4. Werden Roh-Ribosomen 20 h bei $10^{-4}M Mg^{2+}$ im Saccharose-Dichtegradienten getrennt aufbewahrt, anschließend die Mg^{2+} -Konzentration auf $10^{-2}M$ erhöht, die Ribosomen resedimentiert und in E-P analysiert, so erhält man das in Abbildung 5d gezeigte Sedimentationsdiagramm. Rund 30 % der Ribosomen sedimentieren mit 100S, rund 30 % mit 70S, das restliche Material zum größeren Teil mit 50S und wenig mit 28S.

Aus den Befunden kann entnommen werden, daß eine Dissoziation bei $3 \cdot 10^{-4}M Mg^{2+}$ die Ribosomen von *L. viridescens* nicht verändert.

Die 70S-Ribosomen wurden durch $0,4 M NH_4Cl$ im E-P und Sedimentation durch $1 M$ Saccharose in E-P gereinigt. Beim letzten Reinigungsschritt gingen zwar rund 30 % absorbierenden Materials verloren, aber das Verhältnis RNA zu Protein änderte sich nicht wesentlich. Das Absorptionsverhältnis $260 nm/280 nm$ blieb konstant bei 1,92 bis 1,95, nur das Verhältnis $260 nm/235 nm$ stieg von 1,6 auf 1,8. Es scheinen also einige weitere assoziierte Proteinkomponenten durch die Sedimentation durch $1 M$ Saccharose abgelöst zu werden.

Die ribosomalen Untereinheiten wurden aus Roh-Ribosomen präpariert, die bereits durch 0,4 M NH_4Cl sedimentiert waren. Die Sedimentation durch den Saccharose-Dichtegradienten ersetzte die Reinigung durch 1 M Saccharose-Sedimentation. Nachdem die Untereinheiten getrennt und aus den Zuckerlösungen resedimentiert waren, wurden die gleichen optischen Verhältnisse gemessen wie bei gereinigten 70S-Ribosomen.

Aus 70S-, 50S- und 30S-Ribosomen wurden die ribosomalen Proteine gewonnen und gereinigt, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben ist.

1.3. Muster der ribosomalen Proteine

Für die vergleichenden Untersuchungen mußte zunächst das Muster der ribosomalen Proteine aus Optimal-Zellen von *L. viridescens* mit den beschriebenen Methoden untersucht und bestimmt werden. Dieses wurde mit dem bekannten Muster der ribosomalen Proteine von *E. coli* (51, 52, 55) verglichen. Die erprobten Methoden dienten dann zur Untersuchung der ribosomalen Proteine der Keime, die nach Thiamin-Mangel und nach Thiamin-Restauration geerntet waren.

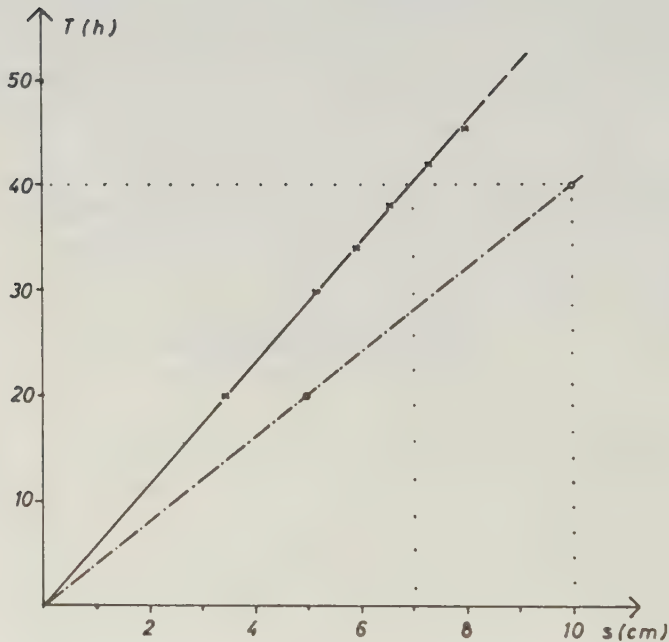
1.3.1. Zweidimensionale Acrylamidgel-Elektrophorese der ribosomalen Proteine

Wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, wurden Optimal-Zellen aufgeschlossen und die 70S-Ribosomen präpariert. Die ribosomalen Proteine wurden von der ribosomalen RNA getrennt und gereinigt. Zur Standardisierung der 1D (siehe "Material und Methoden") dienten ribosomale

Proteine der 70S-Ribosomen aus *E. coli* B, die bei 10 °C und 90 V in 4%igen Gelen elektrophoretisiert wurden. Die Wanderungsstrecken der am schnellsten wandernden Banden (= S6, L7 und L12, siehe 55) wurden nach 20, 30, 34, 38, 42, 44 und 45,5 h ausgemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 6). Die Wanderungsstrecken liegen auf einer Geraden, die durch den Nullpunkt führt. Aufgrund der linearen Abhängigkeit zwischen der Wanderungsstrecke und der Elektrophoresezeit bei konstanten Temperatur- und Spannungsbedingungen konnte für die schnellste Bande der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* eine maximale Elektrophoresezeit von 40 h bei 10 cm Trennstrecke ermittelt werden.

- Abbildung 6 siehe nächste Seite -

Abbildung 6: Eichung der 1. Dimension



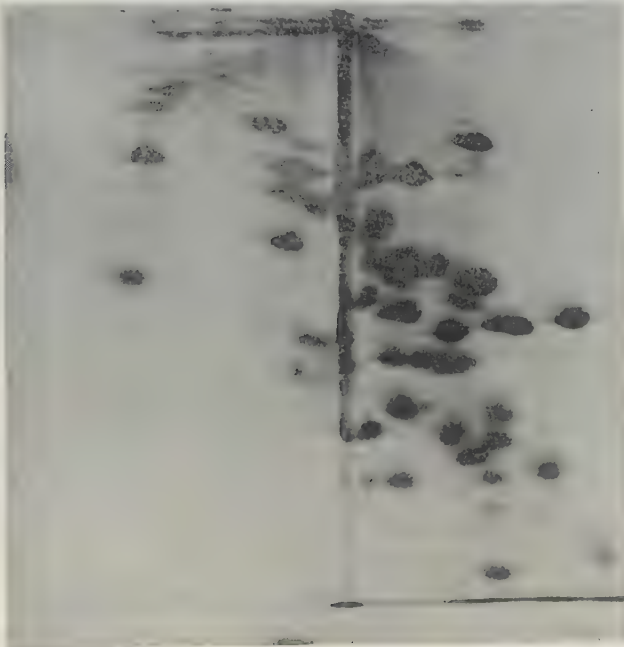
Mit ribosomalen Proteinen aus *E. coli* B wurden Eichläufe in der Dimension (4 % Acrylamid, 90 V, 10 °C) durchgeführt und die Wanderungsstrecken der schnellsten Bande gegen die Zeit aufgetragen. Ribosomales Protein aus *L. viridescens* lief 20 und 40 h unter gleichen Bedingungen.

E. coli $\times \rightarrow \text{—————} \rightarrow$ L. viridescens $\times \circ \text{—} \cdot \text{—} \cdot \text{—} \cdot \text{—} \circ$

Die ribosomalen Proteine der 70S-Ribosomen aus Optimal-Zellen von *L. viridescens* wurden dann mit der Technik der zweidimensionalen Acrylamidgel-Elektrophorese analytisch aufgetrennt (Abbildung 7). Es wurden rund 8 mg

in dem Substanzgel gelöst, daher zeigt das Muster so dicke Flecken. In der zweiten Dimension wird aber noch relativ viel Protein aus dem Substanzgel über die Platte verteilt, so daß der starke senkrechte Streifen in der Mitte der Abbildung 7 entsteht. Dieser Streifen wird eventuell durch solche ribosomalen Proteine oder Proteinaggregate gebildet, die in der ersten Dimension im Substanzgel liegen geblieben sind.

Abbildung 7: Muster der 70S-ribosomalen Proteine aus *L. viridescens*



Ribosomale Proteine der 70S-Ribosomen aus Optimal-Zellen wurden zweidimensional durch Elektrophorese in Acrylamidgelen aufgetrennt. In der 1. Dimension (4 % Acrylamid, pH 8,6, 90 V, 40 h) sind die Anode links und die Kathode rechts, in der 2. Dimension (18 % Acrylamid, pH 4,6, 120 V, 33 h) sind die Anode oben und die Kathode unten angelegt.

Die Abbildung 7 zeigt über 50 Flecken, die nach den Autoren der Methode ein einzelnes oder höchstens zwei ribosomale Proteinen verursachen. Durch die relativ großen Poren des Gels der 1. Dimension werden die ribosomalen Proteine im ersten Teil der elektrophoretischen Trennung bevorzugt nach ihrer Ladung bei pH 8,6 getrennt. Daher besitzen alle ribosomalen Proteine, die in die linke Plattenhälfte gewandert sind, einen isoelektrischen Punkt (= iP) kleiner als pH 8,6 und die in der rechten Hälfte einen iP größer als pH 8,6. Die engen Maschen des Gels in der 2. Dimension verursachen im zweiten Teil der elektrophoretischen Trennung eine Wanderung der ribosomalen Proteine bevorzugt nach ihrem Molekulargewicht. Die Tertiärstruktur der Proteine scheint durch 6 M Harnstoff in allen Trenngelen aufgelöst und bei dieser elektrophoretischen Trennmethode keine Rolle zu spielen.

Wenn man jedoch versucht, ribosomales Protein nach Abtrennung von der ribosomalen RNA aus der Essigsäure-Lösung direkt in das Substanzgel umzudialysieren (siehe "Material und Methoden") und diese Probe direkt in die zweidimensionale Elektrophorese einsetzt, so erhält man ein überraschendes Bild (Abbildung 7a). Das gesamte Muster der ribosomalen Proteine ist zur Anode in der ersten Dimension verschoben. Die einzelnen Proteine werden nicht in der ersten, wohl aber in der zweiten Dimension konzentriert, daher erscheinen sie als waagerechte parallele Striche. Eine Deutung dieses Effektes ist nur möglich, wenn man annimmt, daß der Harnstoff in den Gelen einen zeitabhängigen Denaturierungsprozeß an den Proteinen ausübt. Harnstoff setzt man allgemein Gelen zur Trennung der ribosomalen Proteine zu, um die Aggregatbildung zu verhindern. Wirkt er aber längere Zeit auf die Proteine ein, so werden diese wahrscheinlich partiell aufgefalted, so daß Ladungen, die sonst im Inneren des globulären Proteinmoleküls verdeckt und abgesättigt sind, zur Geltung kommen.

Abbildung 7a): Ribosomale Proteine aus *L. viridescens*.
Muster einer eingeeingten und umdialysierten
Probe



Ribosomales Protein aus 70S-Ribosomen wurde am Rotationsverdampfer eingeeingt und aus der Essigsäure direkt in das Substanzgel der 1. Dimension umdialysiert. Eine Probe wurde in der Elektrophorese unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 7 getrennt.

Diese Ladungen müssen bevorzugt negativer Natur sein und nicht gleichmäßig in einer Proteinart frei werden. So könnte eine Verschmierung der einzelnen Proteinbanden in der ersten Dimension erklärt werden. Einen weiteren Hinweis für diese Theorie lieferten Proben von ribosomalen Proteinen, die gefriergetrocknet und dann im Substanzgel

gelöst 8 Tage bei 10 °C aufgehoben waren. In der ersten Dimension wurden auch hier keine Banden konzentriert und die diffusen Bereiche der Proteine allgemein zur Anode verschoben (siehe Abbildung 22, Gel 1 und 5). Die nachträgliche Schärfung der Proteinbanden in der zweiten Dimension beruht vielleicht auf dem gleichbleibenden Molekulargewicht der Proteine. Für alle weiteren Versuche wurde gefriergetrocknetes ribosomales Protein erst unmittelbar vor der Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese im Substanzgel gelöst.

Abbildung 8 zeigt ebenfalls das Muster der 70S-ribosomalen Proteine aus *L. viridescens*. Die Züchtung der Zellen, Präparation der ribosomalen Proteine und Trennung der Proteine in der zweidimensionalen Elektrophorese wurden in einem getrennten Versuch zu Abbildung 7 durchgeführt und sollten die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen zeigen. Nur waren jetzt 1,5 mg Proteingemisch im Substanzgel der ersten Dimension gelöst worden. Das Substanzgel polymerisierte in diesem Versuch auch nicht mit Persulfat, sondern allein mit Riboflavin. Schließlich wurde auf die Dialyse des Gels der ersten Dimension verzichtet und das Gelstäbchen sofort als Substanzgel in die zweite Dimension eingesetzt. Das Muster der ribosomalen Proteine in Abbildung 8 ist mit dem in Abbildung 7 vergleichbar. Die einzelnen Flecken erscheinen in Abb. 8 zwar wesentlich schwächer, sind aber gut zu identifizieren. Die dicke senkrechte Mittellinie in Abbildung 7 ist in Abbildung 8 nicht mehr zu sehen.

- Abbildung 8 siehe nächste Seite -

**Abbildung 8: Muster der 70S-ribosomalen Proteine aus
*L. viridescens***



Zucht-, Präparations- und Elektrophoresebedingungen sind die gleichen wie für Abbildung 7. Es wurden nur statt 8 mg 1,5 mg Proteingemisch im Substanzgel der 1. Dimension gelöst und das Substanzgel allein mit Riboflavin polymerisiert. Das Gel der 1. Dimension wurde außerdem hier nicht dialysiert.

Sowohl in Abbildung 7 als auch in Abbildung 8 schienen in der Pufferfront der zweiten Dimension noch Proteine enthalten zu sein, die selbst bei 18%igem Acrylamid nicht aufgetrennt werden konnten. Daher wurde in einem Versuch die Porenweite des Trenngels der 2. Dimension

weiter verengt und so versucht, eine höhere Auflösung des Musters zu erreichen. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. In der unteren rechten Ecke der Platte werden zwei weitere Flecken sichtbar, die in Abbildung 7 und 8 als anfärbbare Bestandteile mit der Pufferfront gelaufen sind. Die Wanderungsstrecken der übrigen Proteine in der zweiten Dimension sind jetzt generell verkürzt, das Muster der ribosomalen Proteine ist aber das gleiche wie in Abbildung 8.

Abbildung 9: Ribosomale Proteine aus 70S-Ribosomen aus *L. viridescens*



Die Elektrophoresebedingungen waren wie für Abbildung 8, nur wurden 2 mg Proteingemisch aufgetragen, und die 2. Dimension war 19%ig an Acrylamid.

Eine Auftrennung der ribosomalen Proteine der 30S- und 50S-Untereinheiten erlaubt eine Zuordnung der im 70S-Muster erhaltenen Flecken. Weiterhin bietet die Methode die Möglichkeit, die einzelnen ribosomalen Proteine von *L. viridescens* nach dem Vorschlag von Kaltschmidt und Wittmann⁵⁵⁾ zu bezeichnen. Alle Proteine der großen (large)Untereinheit (= 50S) erhalten die Bezeichnung „L“, alle Proteine der kleinen (small)Untereinheit (= 30S) die Bezeichnung „S“. Numeriert werden die Proteine nach ihrer Lage im Elektropherogramm.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Muster der ribosomalen Proteine der ribosomalen Untereinheiten aus Optimal-Zellen von *Lactobacillus viridescens*. Abbildung 10 - Muster der Proteine der 30S-Untereinheit - bringt zwei Elektrophoresen. Beim Versuch, dargestellt in Abbildung 10 a), sind 2 mg Proteingemisch aufgetragen, in Abbildung 10 b) 4 mg. Ferner wurden 3,5 mg (Abbildung 11 a) und 6,5 mg (Abbildung 11 b) 50S-Proteine getrennt. Die Abbildungen 10 b) und 11 b) weisen aus unbekannten Gründen eine geringere Trennung als Abbildungen 10 a) und 11 a) auf. Das untere Viertel der Muster wurde nicht aufgelöst, die Proteine des nicht getrennten Teils werden in der Pufferfront angefärbt. Dieser Versuch erlaubt aber eine genauere Identifizierung der einzelnen Flecken im Mittelteil des Musters, da hier die Flecken etwas weiter auseinandergezogen wurden als in den Versuchen Abbildungen 10 a) und 11 a). Die Muster der ribosomalen Proteine der Untereinheiten zeigen, daß die Präparation der Untereinheiten keine vollkommen sauberen 30S- und 50S-Partikel ergibt. Auf allen vier Platten ist ein leichter Untergrund zu sehen, der auf geringe Verunreinigungen mit ribosomalen Proteinen der jeweils zugehörigen anderen Untereinheit zurückzuführen ist. Diese Verunreinigung ist in den Mustern der 30S-ribosomalen Proteine viel deutlicher als in denen der 50S-Muster. Das ist in guter Übereinstimmung mit den Analysen der Ultrazentrifugation.

Abbil-
dung 10:

Muster der
30S-ribo-
somalen
Proteine
aus
L. viridescens



Abbildung
10 a):

Abbildung
10 b):

Elektro-
phorese-
bedingun-
gen wie
in Abb. 7.

Erläute-
rungen
siehe
Text



Abbildung 11:
Muster der
50S-ribo-
somalen
Proteine
aus *L.*
viridescens



Abbildung 11 a):

Abbildung 11 b):

Elektro-
phorese-
bedingun-
gen wie
in Abb. 7.

Erläute-
rungen
siehe
Text

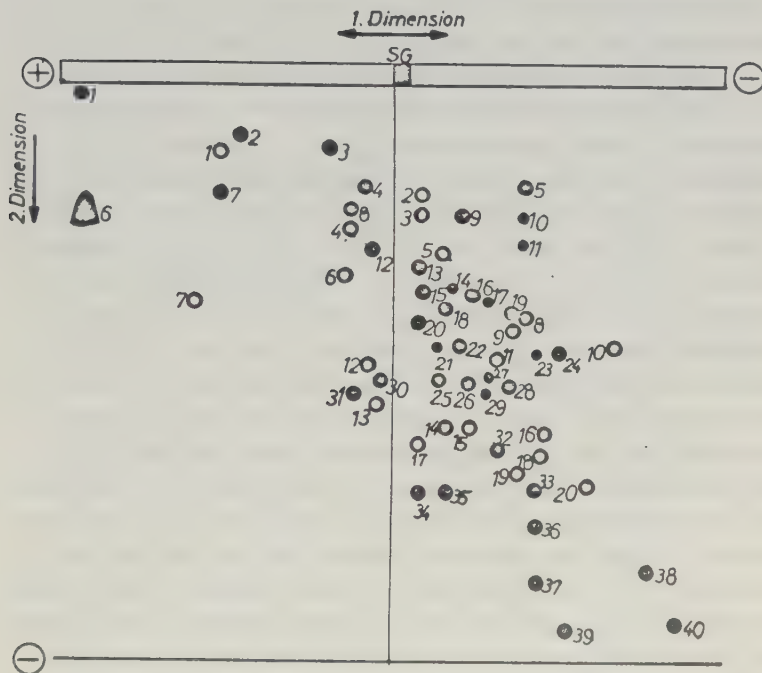


Die Muster in Abbildungen 10 und 11 gestatten eine Zuordnung der ribosomalen Proteine zu den ribosomalen Untereinheiten. Jedem Fleck der Abbildungen 7 und 8 kann ein entsprechender Fleck in den Abbildungen 10 und 11 zugewiesen werden. Das Muster der ribosomalen Proteine aus *Lactobacillus viridescens* läßt sich daher in einem Schema (Abbildung 12) zusammenfassen und bezeichnen.

S1 ist zwar oft schwach angefärbt, aber eindeutig der 30S-Untereinheit zuzuordnen. S2 zeigt von Versuch zu Versuch unterschiedliche Anfärbbarkeit. S3 ist stets deutlich zu sehen, erscheint aber ebenfalls, wenn auch in geringem Maße, im Muster der 50S-Proteine. S4 ist eindeutig zu identifizieren, ebenso S5, S6 und S7. S8 wandert fast in die gleiche Position wie L19 und ist daher nicht so leicht, aber doch eindeutig zu bestimmen. S9, S10 und S11 bereiten keine Schwierigkeiten bei der Identifikation. S12 und S13 sind stets nur schwach angefärbt, besonders im Muster der 70S-Proteine. S14, S16, S17, S18 und S19 bilden eine charakteristische Gruppe des 30S-Musters. S15 ist zwar stets im 30S-Muster zu finden, aber nur sehr schwach anfärbbar. Schließlich vervollständigt S20 das Muster der ribosomalen Proteine der 30S-Ribosomen von *L. viridescens*. 6 der 20 identifizierten 30S-ribosomalen Proteine haben einen iP kleiner als pH 8,6 (S1, S4, S6, S7, S12 und S13). Alle übrigen 14 Proteine müssen einen iP größer als pH 8,6 besitzen, da sie in der rechten Hälfte der Platte zu finden sind.

- Abbildung 12 siehe nächste Seite -

Abbildung 12: Muster (schematisch) und Bezeichnung der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens*



Die Bezeichnung der einzelnen Proteine erfolgte nach⁵⁵⁾.

○ = 30S-ribosomale Proteine (S)

● = 50S-ribosomale Proteine (L)

SG = Substanzgel.

Die Wanderungsrichtung im elektrischen Feld ist für beide Dimensionen angegeben.

L1 scheint ein relativ hohes Molekulargewicht und einen iP nahe pH 4,6 zu besitzen. In der 1. Dimension wandert L1 nämlich zusammen mit L6. In der 2. Dimension ist L1 oft gar nicht oder nur am obersten Rand der Platte zu finden (Abbildung 9). L2 ist in 70S-Mustern stets, in 50S-Mustern nur selten und dann noch schwach (Abbildung 11 b) zu finden. L3 bis L9 sind eindeutig zu identifizieren. L6 erscheint stets als seltsam nach unten breiter werdender, wenig konzentrierter Fleck. L10 und L11 sind schwache Flecken des 50S-Musters, die auch Artefakte darstellen können. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, daß auch über L5 stets eine Reihe schwacher Flecken in gerader Reihe bis zur Oberkante der Gelplatte verteilt sind. Eventuell handelt es sich hier um Aggregate und nicht um konkrete ribosomale Proteine. L12 ist leicht zu identifizieren, ebenso L13, obwohl letzteres dicht neben S5 liegt. L14 bis L18 bilden eine charakteristische Gruppe für 50S-ribosomale Proteine aus *L. viridescens*, die in Abbildungen 7 und 11 deutlich zu sehen ist. Allerdings erscheinen in Abbildungen 8 und 9 nur 3 bis 4 Flecken an gleicher Stelle. Da L16 und L17 und eventuell auch noch L14 sehr eng beieinander liegen, ist anzunehmen, daß die Versuche der Abbildungen 8 und 9 durch eine schlechtere Trennung in der 1. Dimension eine Auflösung dieser Flecken nicht ermöglichten. L19 ist von S8 schwer zu unterscheiden. L20 und L22 sind deutlich gefärbt. L21 ist ein kleinerer Fleck und wird von L22 halb verdeckt. L23 und L24 werden nur in der 1. Dimension schwach getrennt und wandern in der 2. Dimension gleich weit. Daher sind sie bei schlechteren Trennungen in der 1. Dimension nicht zu unterscheiden (Abbildungen 8, 9). L25 bis L29 bilden wie L14 bis L18 eine sehr charakteristische Gruppe im 50S-Muster. Für L26 bis L29 gilt das gleiche wie für L14, L16 und L17, die Flecken unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit so wenig, daß sie unter Umständen nicht getrennt werden.

L30 löst sich in der ersten Dimension kaum aus dem Substanzgel und muß einen pI dicht unter pH 8,6 besitzen. L31 ist schwach angefärbt, aber zuzuordnen. L32 bis L38 sind deutlich zu identifizieren. L39 und L40 wurden nur in Abbildung 9 als Flecken auf der Platte gefunden, sind aber in den anderen Abbildungen in der Pufferfront zu sehen. Der Vergleich zwischen Abbildung 10 a) und 11 a) zeigt, daß beide Proteine nur im 50S-Muster zu finden sind. 10 der 50S-ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* haben einen pI niedriger als pH 8,6 (i.e. L1, L2, L3, L4, L6, L7, L8, L12, L30 und L31), die anderen 30 sind „basischer“ als pH 8,6.

Ribosomale Proteine aus Optimal-Zellen von *L. viridescens* zeigen also in der zweidimensionalen Acrylamidgel-Elektrophorese 20 Flecken, die der 30S-ribosomalen Untereinheit, und bis zu 40 Flecken, die der 50S-ribosomalen Untereinheit zugeordnet werden können. Die bisherige Analyse der ribosomalen Proteinmuster bietet die Möglichkeit, mit ribosomalen Proteinmustern aus *E. coli* zu vergleichen und die Muster der ribosomalen Proteine aus Mangel-Zellen und Restaurations-Zellen zu untersuchen.

1.3.2. Vergleich der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* und *E. coli*

Das Muster der ribosomalen Proteine aus *E. coli* ist untersucht und veröffentlicht (51, 52, 55, 57, 109). In den Versuchen zu dieser Arbeit diente das Gemisch der ribosomalen Proteine der 70S-Ribosomen aus *E. coli* B, das im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Abt. Wittmann, Berlin) präpariert und gefriergetrocknet war, als Vergleich. Es wurde in der zweidimensionalen Elektrophorese als Referenz benutzt und sollte die Reproduzierbarkeit der Methode

zeigen. Abbildung 13 stellt das Muster der ribosomalen Proteine von *E. coli* 70S-Ribosomen dar. Es läßt sich durchaus mit den veröffentlichten Mustern vergleichen.

Abbildung 13: Muster der ribosomalen Proteine aus
E. coli B

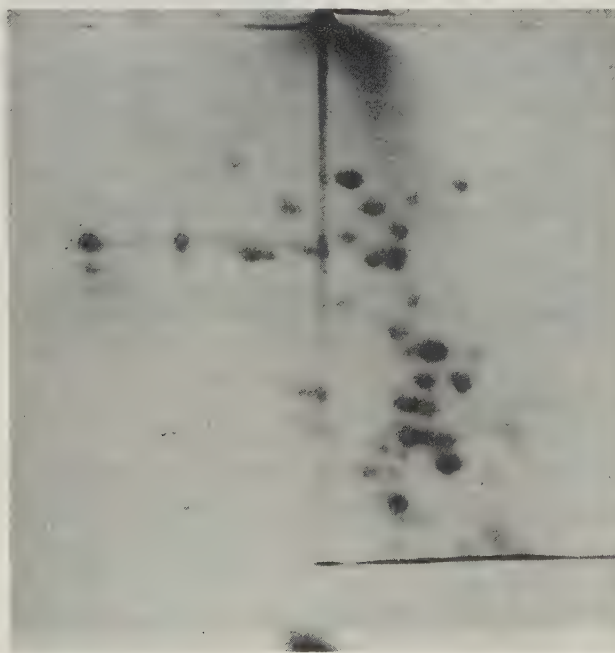


Elektrophoresebedingungen, wie in
Abbildung 7 angegeben

Abbildung 14 zeigt das Muster der *E. coli* ribosomalen Proteine, das im gleichen Versuch wie die Abbildungen 10 b) und 11 b) entstanden ist. Die beiden Abbildungen 13 und 14 bestätigen, daß die Elektrophorese der ribo-

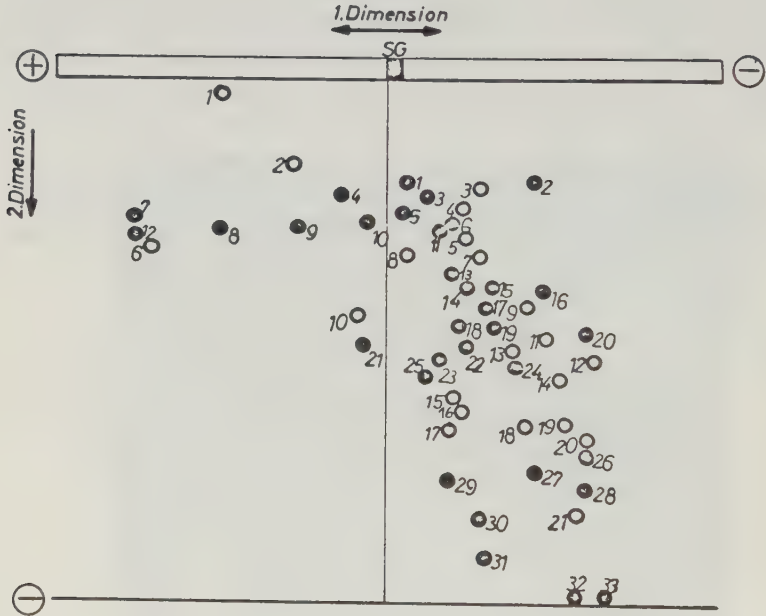
somalen Proteine mit der zweidimensionalen Technik gut reproduzierbare Ergebnisse bringt. Schließlich stellt Abbildung 15 das schematisierte Muster der ribosomalen Proteine aus *E. coli* dar. Dieses Muster ist durch Vergleich mehrerer 2D-Elektrophoresen entstanden und repräsentiert das entsprechende Schema für ribosomale Proteine aus *E. coli* wie Abbildung 12 für ribosomale Proteine aus *L. viridescens*. Von K a l t s c h m i d t und W i t t - m a n n ⁵⁵⁾ werden 21 30S- und 34 50S-ribosomale Proteine beschrieben. L₃₄ wandert unter diesen elektrophoretischen Bedingungen aus dem Gel der 1. Dimension an der Seite der Kathode aus⁵⁵⁾.

Abbildung 14: Muster der ribosomalen Proteine aus *E. coli* B



Das Muster entstand unter gleichen Bedingungen wie Abbildungen 10 b) und 11 b).

Abbildung 15: Muster (schematisch) und Bezeichnung der ribosomalen Proteine aus *E. coli* B



Es wurde die gleiche Methode der Benennung wie in Abbildung 12 angewandt.

Abbildung 6 zeigte schon, daß die Banden der ribosomalen Proteine aus *E. coli* und aus *L. viridescens*, die in der ersten Dimension am schnellsten wandern, unterschiedlich laufen. L1 und L6 aus *L. viridescens* bewegen sich als eine Bande wesentlich schneller zur Anode als die Bande, die von S6, L7 und L12 aus *E. coli* gebildet wird. *L. viridescens* besitzt auch mehr ribosomale Proteine mit einem pI niedriger als $pH\ 8,6$ (16) als *E. coli* (11). Die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine beider Bak-

terienarten sind wohl im Mittel ähnlich. *L. viridescens* scheint allerdings bis zu 6 ribosomale Proteine mehr an der 50S-Untereinheit zu haben als *E. coli*. In der Literatur herrscht jedoch noch keine letzte Klarheit über die Anzahl der ribosomalen Proteine der 50S-Untereinheit aus *E. coli*. So werden mindestens 3 ribosomale Proteine beschrieben^{77, 86, 199)}, die im Muster der 50S-ribosomalen Proteine⁵⁵⁾ keine Position und Bezeichnung erhalten haben.

Es sind auch in den publizierten Mustern stets schwächere, aber deutliche Flecken zu finden. So erscheinen solche im 70S-Muster aus *E. coli* z. B. links über L7, unter L8, rechts neben L9, über S10 und rechts neben L29. Diese zusätzlichen Flecken haben in der Literatur keine Zuordnung oder Bezeichnung erhalten.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die zweidimensionale Acrylamidgel-Elektrophorese als analytische Auftrennung aussagekräftig genug ist. Durch ihre hohe Empfindlichkeit können Artefakte, die durch präparative Schritte z. B. die Gefriertrocknung der ribosomalen Proteine entstanden sind, Flecken verursachen, die fälschlicherweise als ribosomale Proteine gedeutet werden. Andererseits ist gerade die hohe Auflösung bestechend. Die Veränderung nur einer einzigen Ladung am Protein läßt bei sonst gleicher Primärstruktur zwei Flecken im Muster erscheinen (z. B. bei *E. coli* L7 und L12¹¹⁵⁾).

In den Versuchen für diese Arbeit wurden auf den Platten der zweidimensionalen Elektrophorese der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* immer wieder schwache Flecken besonders im linken Teil der Muster beobachtet. Ihre Intensität und ihre Lage schwankten jedoch von Züchtung zu Züchtung, Präparation zu Präparation und Elektrophorese zu Elektrophorese. Es kann nicht entschieden werden,

inwieweit der Wachstumszustand (auch bei logarithmisch wachsenden Optimal-Zellen) oder (und) die Gefrier-trocknung der ribosomalen Proteine Einfluß auf die Entstehung dieser Fleckchen haben.

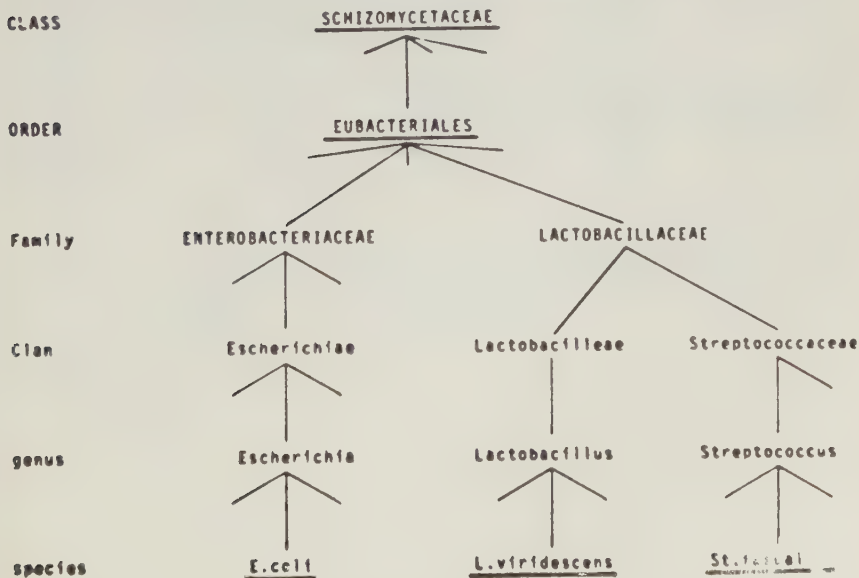
Ungeachtet der angeschnittenen methodischen Probleme läßt der Vergleich der Abbildungen 12 und 15 die Beantwortung der Frage zu, ob es in den beiden Mustern der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* und *E. coli* auch Flecken gibt, die die gleiche Position erreichen. Die Antwort gibt Tabelle 2. Rund 20 % der Flecken werden in beiden Mustern an genau der gleichen Stelle gefunden. Dieses Ergebnis wurde von Herrn Prof. Dr. H. G. W i t t m a n n (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) mündlich bestätigt. Nach der systematischen Stellung von *L. viridescens* im Vergleich zu *E. coli* (Abbildung 16) ist es erstaunlich, daß überhaupt ribosomale Proteine der beiden Arten die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit in der zweidimensionalen Elektrophorese besitzen. Sicherlich ist dieses gleichförmige Verhalten nicht auf gleiche Primärstruktur der ribosomalen Proteine zu gründen. Auf der anderen Seite wandern alle übrigen ribosomalen Proteine, die nicht in der Tabelle 2 aufgeführt sind, unterschiedlich. Dieses differierende Verhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese oder auch in der Carboxymethyl-Cellulose-Chromatographie kann als taxonomisches Merkmal herangezogen werden^{83, 84}).

- Tabelle 2 sowie Abbildung 16 siehe nächste Seite -

Tabelle 2: Ribosomale Proteine aus *L. viridescens* und *E. coli*, die die gleiche Position in der zweidimensionalen Elektrophorese einnehmen:

<u>L. vir.</u>	<u>E. coli</u>	<u>L. vir.</u>	<u>E. coli</u>	<u>L. vir.</u>	<u>E. coli</u>
S8	= S9	L5	= L2	S2	= L3
S11	= S13	L14	= L13	S20	= L28
S14	= S17	L16	= L14		
		L17	= L15	L9	= S4
		L22	= L22	L23	= S11
		L35	= L29		

Abbildung 16: Systematische Stellung von *Lactobacillus viridescens* und *Escherichia coli*



1.4. Aminosäureanalysen der ribosomalen Proteine

Die Aminosäureanalyse der 70S-ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* ermöglicht einen Vergleich mit entsprechenden Ergebnissen für *E. coli*^{74, 104, 124)} oder *Streptococcus faecalis*⁹⁾. Die Tabelle 3 zeigt, daß sich alle drei Bakterienarten in einigen Aminosäuregehalten signifikant unterscheiden. *L. viridescens* hat mehr Thr, Ser, Met und Tyr und weniger Cys und Leu als *E. coli*, mehr Ser, Ala, Tyr, His und Arg und weniger Asp, Glu und Pro als *Str. faecalis*. Diese Unterschiede sind aus der systematischen Stellung der angeführten Organismen verständlich und sprechen dafür, daß die ribosomalen Proteine verschieden sind und sich auch in der Elektrophorese differenziert verhalten.

- Tabelle 3 siehe nächste Seite -

Tabelle 3: Aminosäureanalyse der 70S-ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* und der Vergleich mit *E. coli* und *Streptococcus faecalis*

Aminosäure	<i>E. coli</i> ¹⁾ (Mol%)	<i>L. vir.</i> (Mol%)	<i>Str. faec.</i> ⁴⁾ (Mol%)
Asp	8,4	8,4	11,5
Thr	5,1	6,3	5,7
Ser	4,4	6,4	5,0
Glu	10,4	9,5	11,3
Pro	3,6	3,3	4,3
Gly	8,2	8,7	8,9
Ala	11,5	10,9	9,7
Cys	0,6 ²⁾	0,2	0,3
Val	9,3	9,2	8,7
Met	1,8	2,1	2,0
Ile	5,4	5,4	5,7
Leu	7,4	6,3	7,0
Tyr	1,6	2,7	2,1
Phe	3,0	2,9	2,7
His	1,9	1,8	1,3
Lys	9,5	8,7	8,3
Arg	7,2	7,1	5,3
Trp	2,0 ³⁾	0,2	---

1) Die Werte für *E. coli* wurden aus Angaben in der Literatur^{74, 104, 124)} gemittelt,

2) aus^{74, 104)}

3) aus^{104, 124)},

4) aus⁹⁾.

2. Veränderungen an Ribosomen aus Thiamin-Mangel-Zellen und Restaurations-Zellen

2.1 Quantitative Auswertung der Präparationsstufen

Die Methoden zur Präparation der Roh-Ribosomen, der gereinigten Ribosomen, des ribosomalen Proteins und der ribosomalen RNA sind beschrieben. Die Berechnung der Ausbeuten und der Vergleich der Ergebnisse für Mangel- und Restaurations-Ribosomen zu Optimal-Ribosomen wurden in der Tabelle 4 zusammengestellt. Der Gehalt an Roh-Ribosomen sinkt gegenüber Optimal-Zellen in Mangel-Zellen auf 48 % ab und steigt nach 45 Minuten Restauration auf fast 70 % an. Der Verlust nach Sedimentation durch 1 M Saccharose ist in allen drei Proben gleich (27 bis 31 %). Der Gehalt an gereinigten Ribosomen wird zu 45 % in Mangel- und 60 % in Restaurationszellen, verglichen mit Optimal-Zellen, gefunden. Werden aus den gereinigten Ribosomen parallel die ribosomalen Proteine präpariert, so erhält man 58 % ribosomales Protein aus Mangel- und 55 % aus Restaurations-Ribosomen, verglichen mit Optimal-Ribosomen (bezogen auf mg Protein pro g Zellen). Die Berechnung der Proteinausbeute im Verhältnis zur Menge der eingesetzten gereinigten Ribosomen (in $OD_{260\text{ nm}}$) zeigt: Restaurations-Ribosomen haben annähernd die gleiche Menge ribosomales Protein (95 %); bei Ribosomen aus Mangel-Zellen bringt die Berechnung jedoch eine um 28 % höhere Ausbeute als bei Ribosomen aus Optimal-Zellen.

Die ribosomale RNA aus Optimal-Zellen zeigt durch die Verhältnisse 2,34 (für 260/280) und 2,11 (für 260/235) eine hohe Reinheit. Auch die ribosomale RNA aus Restaurationszellen ist bei Verhältnissen von 2,07 (260/280) und 2,05 (260/235) nur mit wenig Protein kontaminiert.

Tabelle 4: Vergleich der Ausbeute der einzelnen Präparationsschritte

	Einheit	Optimal		Hunger		Restauration	
		Menge	%	Menge	%	Menge	%
Roh-Ribosomen	(OD/g Zellen)	181	100	87	48	125	69
gereinigte Ribosomen	(OD/g Zellen)	132	100	60	45	79	60
ribosomales Protein	(mg/g Zellen)	2,9	100	1,7	58	1,6	55
ribosomales Protein	(mg/100 OD Ribosomen)	2,2	100	2,8	128	2,1	95
ribosomale RNA	(OD/g Zellen)	144	100	50	35	75	52
ribosomale RNA	(OD/100 OD Ribosomen)	108	100	83	77	95	88

Die optische Dichte (OD) wurde bei 260 nm bestimmt, g Zellen ist Feuchtwicht.

Die ribosomale RNA aus Mangel-Zellen weist bei Verhältnissen von 1,96 (260/280) und 1,92 (260/235) Werte auf, die darauf schließen lassen, daß diese RNA nicht frei ist von Proteinen. Die ribosomalen RNAs aus Optimal-Zellen, aus Mangel-Zellen und aus Restaurationszellen wurden daher elektrophoretisch näher untersucht.

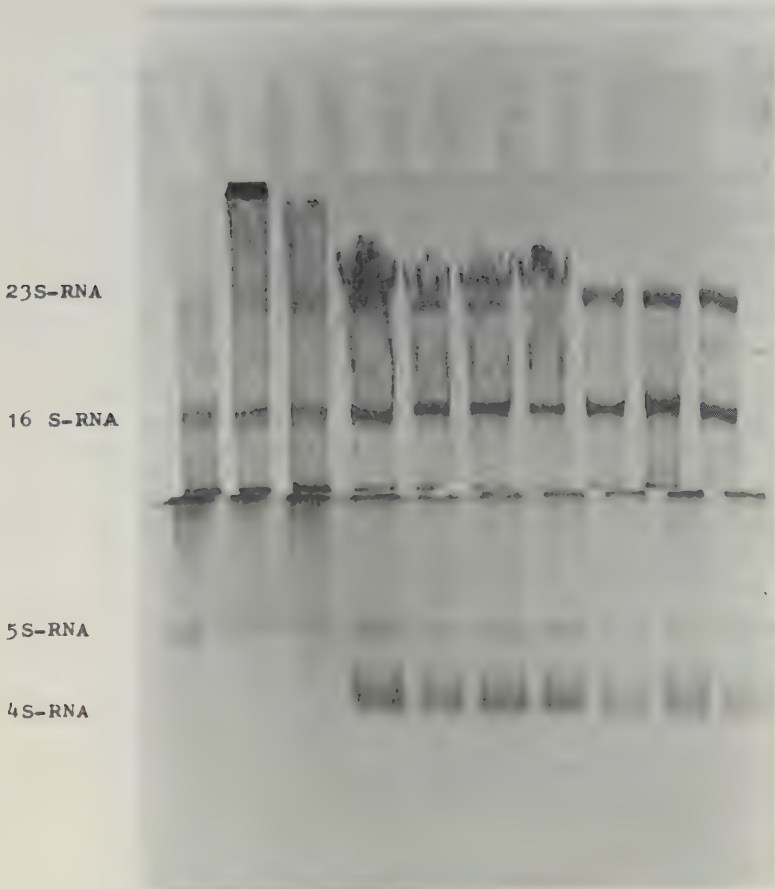
2.2. Elektrophoretische Analyse der ribosomalen RNA

Eine elektrophoretische Auftrennung der RNA aus Bakterien ist bisher vorwiegend mit phenolbehandelten Extrakten durchgeführt worden. Da jedoch bei der Präparation der ribosomalen Proteine große Mengen ribosomale RNA anfielen, war es naheliegend zu versuchen, essigsäuregefällte RNA aufzubereiten und elektrophoretisch mit phenolextrahierter RNA aus *L. viridescens* zu vergleichen. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 17 dargestellt.

In den methylenblau-gefärbten Gelplatten sind 4S-, 5S-, 16S- und 23S-RNA gut getrennt. Die Proben 1 bis 3 enthalten essigsäuregefällte und wieder aufbereitete ribosomale RNA aus Optimal-, Mangel- und Restaurations-Zellen. Die Proben 4 bis 10 sind phenolextrahierte Gesamt-RNA-Präparate aus Zellen, die bei 2,5 bis 10 ng Thiamin/ml TAM-Medium und bei optimalen Thiamin-Konzentrationen gewachsen waren.

Abbildung 17 zeigt deutlich, daß trotz unterschiedlicher Extraktionsmethoden die einzelnen RNA-Spezies gleiches elektrophoretisches Verhalten besitzen. In den Proben 1 bis 3 fehlt natürlich die 4S-RNA, weil die RNA aus Ribosomen gewonnen wurde. Auffällig sind die streifigen, stark anfärbbaren Bereiche in den Proben 2 bis 7 über der 23S-Bande. Dieses in das Gel heterogen eindringende Material muß sehr hohe Molekulargewichte oder abgeschirmte negative Ladungen besitzen.

Abbildung 17: Elektrophorese der ribosomalen und gesamten RNA aus *L. viridescens*-Zellen, die bei unterschiedlichen Thiamin-Konzentrationen gewachsen waren



Probe: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Die Proben 1 bis 3 wurden aus essigsäuregefällter ribosomaler RNA aus Optimal- (1), Mangel- (2) und Restaurationszellen (3), die Proben 4 bis 6 aus phenolextrahierter Gesamt-RNA aus mit 2,5 ng (4), 5 ng (5), 7,5 ng (6), 10 ng (7) und 100 ng (8 bis 10) Thiamin pro ml TAM-Medium gewachsenen Zellen gewonnen. In jeder Tasche sind 4 OD_{260 nm} aufgetragen. Die Elektrophorese dauert rund 4 h bei 300 V. (Die Proben 1 bis 3 bereitete Herr R. Verhagen, die Proben 4 bis 10 Herr Dr. L. Böhne.)

Beide Eigenschaften trafen zu für Nukleoproteinpartikel. Eine differenzierte Färbung der Gele mit „stains all“ unterstützt diese Annahme. In Abbildung 18 zeigt das Bild diese Färbung für die Proben 1 bis 5. Deutlich ist in den Auftrennungen 2, 4 und 5 eine rötliche Färbung neben einem lila Grundton zu erkennen. „stains all“ färbt spezifisch RNA lila, Protein rot und DNA blau.

Die Menge der Ribonucleoproteine scheint von der Menge des im Medium vorhandenen Thiamins abhängig zu sein. Im Thiamin-Mangel ist ihre Konzentration sehr hoch, so daß die Poren des Gels verstopft werden und das Nukleoproteinmaterial direkt unter der Auftragtasche liegen bleibt (Probe 2).

Mit zunehmender Thiamin-Sättigung verschwinden die Ribonucleoproteine (Proben 4 bis 7 in Abbildung 17). In RNA-Extrakten aus Restaurations-Zellen sind sie kaum noch zu finden (Probe 3).

Aus Thiamin-Mangel-Keimen wird bei der Extraktion von Ribonuclein-Säuren nach zwei völlig verschiedenen Extraktionsverfahren ein Ribonucleoproteinkomplex erhalten.

- Abbildung 18 siehe nächste Seite -

Abbildung 18: Differenzierte Färbung der Ribonucleoproteinpartikel

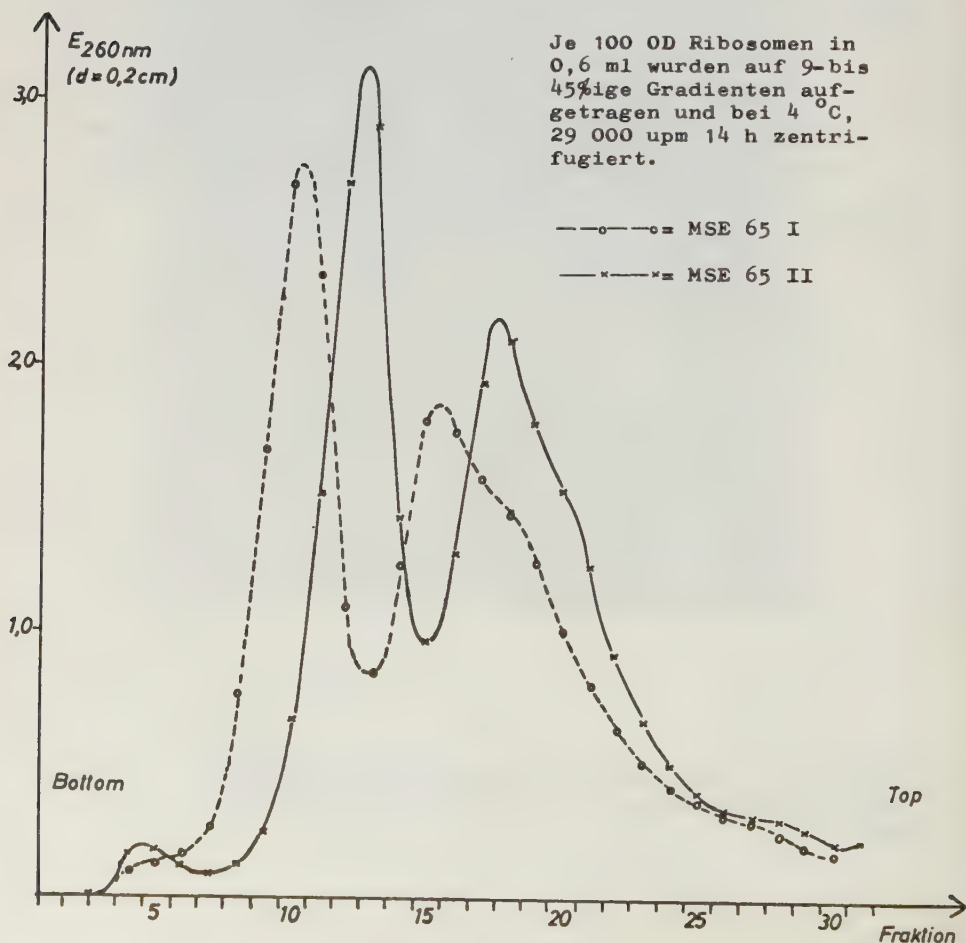


Die Gelplatten (Abbildung 17) wurden völlig entfärbt unter fließendem Wasser und mit „stains all“ neu gefärbt.

2.3. Vergleichende Gradientenzentrifugation der ribosomalen Untereinheiten

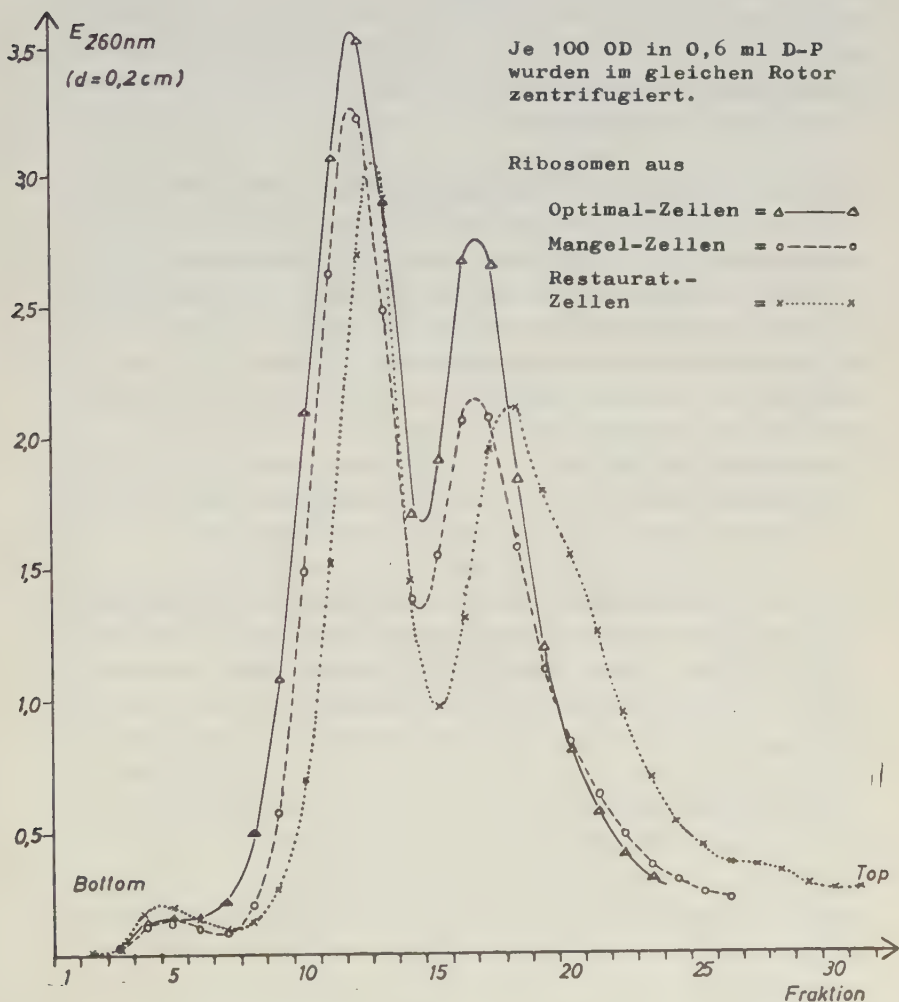
Zur Analyse der Sedimentation der dissoziierten Roh-Ribosomen der drei untersuchten Wachstums-Phasen wurden nur Saccharose-Dichtegradienten verglichen, die gemeinsam im selben Rotor zentrifugiert waren. Gleiche Proben sedimentieren nämlich unter den selben Zentrifugationsbedingungen in verschiedenen Zentrifugen unterschiedlich (Abbildung 19).

Abbildung 19: Sedimentation gleicher Proben unter gleichen Bedingungen in 2 Zentrifugen



Die ribosomalen Partikel aus Optimal-Zellen und Mangel-Zellen sedimentieren in 9- bis 45%igen Saccharose-Dichtegradienten bei $10^{-4}M$ Mg^{2+} vollkommen gleich (Abbildung 20). Die 50S-Untereinheiten zeigen gleich steile Flanken.

Abbildung 20: Sedimentation der ribosomalen Untereinheiten aus verschiedenen Wachstums-Phasen von *L. viridescens*



Der 30S-Gipfel der Mangel-Ribosomen fällt zu niedrigen Saccharose-Konzentrationen etwas flacher ab. Dagegen zeigen die ribosomalen Untereinheiten aus Restaurations-Zellen ein verändertes Sedimentationsverhalten: 50S- und 30S-Partikel wandern etwas langsamer; der 30S-Peak ist nicht symmetrisch, sondern zeigt eine deutliche Schulter in der rechten Flanke. Außerdem erscheint noch absorbierendes Material oberhalb des 30S-Gipfels in den Fraktionen 26 bis 28. In den Fraktionen 4 bis 6 wird ein kleiner Buckel gefunden, der im Gradienten der ribosomalen Partikel aus Restaurations-Zellen am ausgeprägtesten ist, während er sich im Gradienten von Untereinheiten aus Optimal-Zellen kaum absetzt.

Aus dem Verhältnis der Sedimentationsstrecken sollen annähernd die S-Werte der sedimentierenden Partikel bestimmt werden können. Wird der Gipfel der 50S-Untereinheit (Fraktion 12 in Abbildung 18) als 50S in die Rechnung eingesetzt, so erhält man für die Gipfel der 30S-Untereinheiten der Optimal- und Mangel-Ribosomen einen Wert von 38S; die 50S-Partikel aus Restaurations-Zellen sedimentieren dann mit 47S, die 30S-Partikel mit 36S, die Schulter des 30S-Gipfels mit 29S und das nachlaufende Material in Fraktion 27 mit rund 7 bis 10S; der kleine Gipfel am Boden des Gradienten würde einen Wert von 70S erhalten.

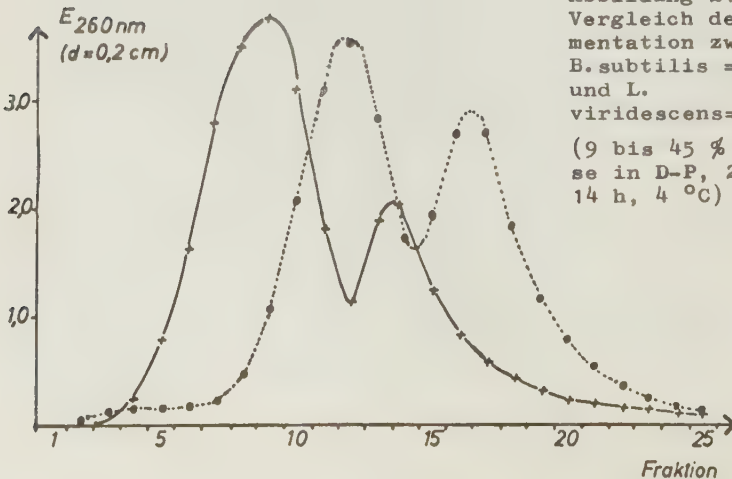
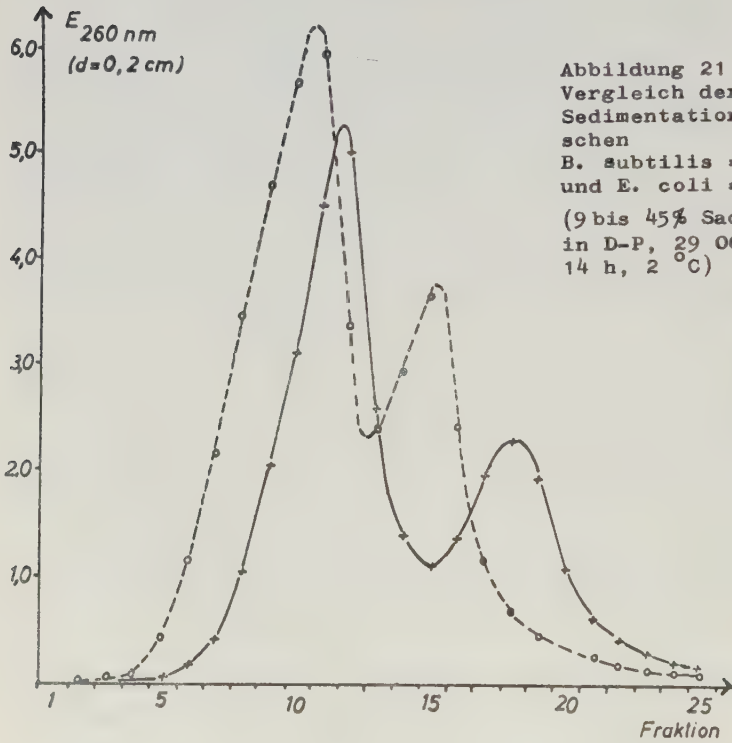
Aus den grob bestimmten S-Werten im Zuckergradienten kann aber nicht auf die Konformation des sedimentierenden Materials geschlossen werden, bzw. eine Konformationsänderung der Partikel würde die Voraussetzung der Methode zur Bestimmung der S-Werte im Zuckergradienten nehmen. Das Verfahren ist sicherlich nicht auf Gradienten anwendbar, in denen Ribosomen-Untereinheiten bei sehr niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen sedimentieren. So verhalten sich Ribosomen aus verschiedenen Bakterienstämmen (*E. coli* MRE 600 und *Bacillus subtilis*) auf den gleichen hier in der Arbeit benutzten 9- bis 45%igen Gradienten unterschiedlich.

Abbildungen 21 a) und 21 b) demonstrieren diese Aussage: B. subtilis-Ribosomen sedimentieren langsamer als die Untereinheiten aus E. coli, aber schneller als die Ribosomen aus L. viridescens. Alle drei Proben sind gleich präpariert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nur wurden die Zentrifugationen zum Vergleich zwischen ribosomalen Untereinheiten aus B. subtilis und E. coli bei 2 °C und zwischen B. subtilis und L. viridescens bei 4 °C durchgeführt, was aber am Ergebnis nichts ändert. Die unterschiedliche Sedimentation kann nur gedeutet werden, wenn angenommen wird, daß die Ribosomen verschiedener Bakterienstämme bei gleich niedriger Mg^{2+} -Konzentration nach gleichen Präparationsbedingungen in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Die S-Werte aller bisher in der analytischen Ultrazentrifuge geprüften Ribosomen der Bakterien sind bei $10^{-2} M Mg^{2+}$ gleich. Auffaltungen der ribosomalen Untereinheiten bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen sind bekannt. Über den Auffaltungsgrad und die daraus resultierenden veränderten Sedimentationsprofile der ribosomalen Untereinheiten verschiedener Bakterienstämme konnte bisher kein Literaturbeleg gefunden werden.

Es bleibt als Ergebnis festzuhalten, daß die ribosomalen Untereinheiten aus Restaurations-Zellen bei $10^{-4} M Mg^{2+}$ im 9- bis 45%igen Saccharose-Dichtegradienten langsamer sedimentieren als die Untereinheiten aus Optimal- und Hunger-Zellen. Es kann optisch absorbierendes Material auf dem Gradienten der Ribosomenzentrifugation von Restaurations-Zellen registriert werden, das mit niedrigeren S-Werten sedimentiert als 30S-Untereinheiten.

- Abbildungen 21, 21 a) und 21 b) siehe nächste Seite -

Abbildung 21: Sedimentation der ribosomalen Untereinheiten aus *E. coli*, *B. subtilis* und *L. viridescens* bei niedriger Mg^{2+} -Konzentration



2.4. Elektrophoretische Trennung der Proteine der 70S-Ribosomen

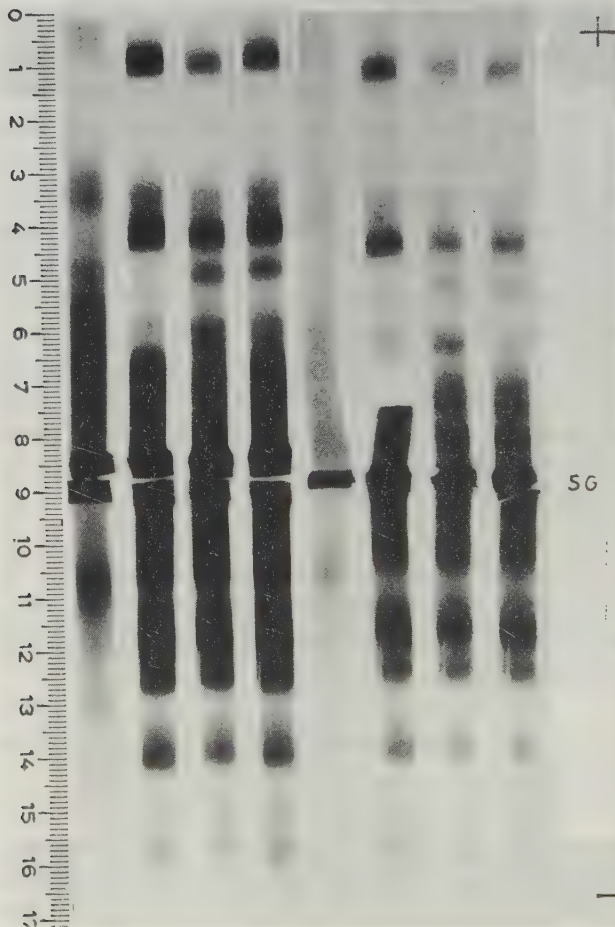
Die ribosomalen Proteine der gereinigten 70S-Ribosomen aus Optimal-, Mangel- und Restaurations-Zellen wurden abgetrennt und gereinigt, wie in "Material und Methoden" beschrieben. In der ersten Dimension wurden die Elektrophoresen in Glasröhrchen (0,5 mm innerer Durchmesser) durchgeführt und die Proteine angefärbt. Abbildung 22 zeigt diese photographierten Gele. In den Substanzgelen (SG) der Proben 2 bis 4 und 6 bis 8 sind jeweils gleiche Mengen ribosomales Protein aufgetragen (in 2 bis 4 je 1 mg in 0,2 ml; in 6 bis 8 je 0,5 mg in 0,1 ml). Die Gele 1 und 5 zeigen die Auftrennung von 0,7 bzw. 0,35 mg gefriergetrocknetem ribosomalen Protein, das vor der Elektrophorese 8 Tage im SG bei 10 °C gelöst war (siehe hierzu den Text zu Abbildung 7a).

Die ribosomalen Proteine aus Optimal-Zellen sind in den Gelen 2 und 6, die aus Mangel-Zellen in den Gelen 3 und 7 und die aus Restaurations-Zellen in den Gelen 4 und 8 elektrophoretisiert.

Der Vergleich der Bandenmuster der Gele in Abbildung 22 bringt folgende Ergebnisse:

Die einzelne Bande bei 0,5 bis 1,0 ist in den Gelen 2 und 6 am stärksten gefärbt, die Färbung nimmt in den Gelen 3 und 7 ab, die Bande wird auch schmaler, erreicht aber in den Gelen 4 und 8 wieder fast ihre Ausgangsintensität. Die Bande 4,1 (in den Gelen 2 bis 4) bzw. 4,5 (in den Gelen 6 bis 8) erscheint in den Gelen 3 und 7 ebenfalls reduziert. Bei 4,9 (Gele 3 und 4) bzw. 5,2 (Gele 7 und 8) ist deutlich eine neue Bande zu erkennen.

Abbildung 22: Elektrophoretische Trennung der ribosomalen Proteine aus Optimal-, Mangel- und Restaurations-Zellen in der 1. Dimension



Gel Nr.: 1 2 3 4 5 6 7 8

Elektrophoresebedingungen: 4 % Acrylamid, pH 8,6
90 V, 40 h bei 10 °C

Gele 1 und 5 = lyophilisiertes ribosomales Protein,
das 8 Tage im SG gelöst bei 10 °C ge-
standen war.

Gele 2 und 6 = ribosomale Proteine aus Optimal-Zellen

Gele 3 und 7 = ribosomale Proteine aus Mangel-Zellen

Gele 4 und 8 = ribosomale Proteine aus Restaurations-Zellen

In den Gelen 3 und 7 ist die Bande bei 5,9 (3) bzw. 6,2 (7) verstärkt. Diese Bande ist in den Gelen 2 und 6 am schwächsten und in den Gelen 4 und 8 mittelmäßig gefärbt.

Es fällt auf, daß alle beschriebenen Veränderungen am stärksten in den Gelen ausgeprägt sind, in denen die ribosomalen Proteine aus Mangel-Zellen getrennt wurden. Diese Veränderungen sind in Gelen mit Protein aus Restaurations-Zellen kaum oder gar nicht mehr festzustellen.

Die deutlichen Veränderungen in der 1. Dimension ließen hoffen, daß auch im zweidimensionalen Muster der ribosomalen Proteine aus den thiaminabhängigen Wachstumsphasen Veränderungen nachgewiesen werden könnten. Die Abbildungen 23 bis 25 zeigen die entsprechenden Muster. Auf den ersten Blick scheinen keine Unterschiede feststellbar. Bei genauerer Betrachtung ist aber zu erkennen:

Der Fleck L1 (siehe Abbildung 12) ist im Mangel verstärkt und verbreitert, seine Intensität nimmt in der Restauration ab.

Zwischen L1 und dem Gel der 1. Dimension (1DG) findet man einige Banden, die im Gel der 1. Dimension verblieben sind und nicht im Gel der 2. Dimension aufgetrennt wurden. Im Optimal-Muster liegen diese unbezeichneten Banden in dem Bereich, der in der 1. Dimension (Abbildung 22) der Strecke 4,0 bis 6,0 entspricht. In diesem Teil waren eine neue und eine verstärkte Bande im Mangel- und Restaurations-Gel zu sehen. Im gleichen Bereich der 2. Dimension verschwinden die im Optimal-Muster beobachteten Banden im 1DG zum größten Teil im Mangel-Muster und erscheinen im Restaurations-Muster teilweise wieder.

Abbildung 23: Zweidimensionales Muster der ribosomalen Proteine aus Optimal-Zellen



Die Elektrophoresebedingungen waren die gleichen wie für Abb.9 beschrieben. Es wurden 2 mg Proteingemisch getrennt.

Im Mangel wird über S1 im 1DG ein Fleck zum Elektroden-Puffer hin (= Anode) stärker, ebenso ein kleiner Fleck an der Grenze zwischen 1DG und 2DG über L3. Die Intensität dieser beiden Flecken nimmt in der Restauration wieder ab.

L2 ist nur in den Mustern aus Optimal- und Restaurations-Zellen zu finden.

Abbildung 24: Zweidimensionales Muster der ribosomalen Proteine aus Mangel-Zellen



2 mg Proteingemisch wurde unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 9 beschrieben getrennt

Einige kleine Flecke links über L3 und links neben L3 und L8 sind im Mangel verschwunden und erscheinen wieder in der Restauration.

L6 hat im Mangel seine relative Wanderung in der 2. Dimension im Vergleich zu S1, L7 und L8 verändert. Es wandert weniger schnell zur Kathode, seine charakteristische Form ist etwas anders. Im Restaurations-Muster sind bei L6 keine Änderungen im Vergleich zum Optimal-Muster festzustellen.

Abbildung 25: Zweidimensionales Muster der ribosomalen Proteine aus Restaurations-Zellen



Es wurden 2 mg Proteingemisch aufgetragen und unter gleichen Bedingungen wie Abbildung 9 getrennt.

L7 zeigt im Mangel statt 1 jetzt 3 deutliche Flecken, die alle dicht übereinander, aber gut sichtbar liegen. Über L5 findet man eine ähnliche Anfärbung zwischen 1DG und 2DG wie über S1 und L3, die im Mangel deutlich verstärkt ist, in der Restauration aber wieder auf die gleiche Intensität wie im Optimal-Muster zurückkehrt. S3 scheint im Mangel in der 2. Dimension etwas schneller zu wandern als S2 und L9.

Der Fleck L11 ist im Mangel deutlich größer als im Optimal-Muster. Auch in der Restauration ist er noch recht deutlich gefärbt.

S10 und L40 wandern im Vergleich zu ihren benachbarten Flecken in der 2. Dimension im Mangel etwas langsamer zur Kathode als in den beiden anderen Wachstumsphasen.

S17 wandert dagegen etwas schneller.

Fast alle Veränderungen im zweidimensionalen Muster der ribosomalen Proteine sind nur im Mangel zu finden und nicht oder kaum mehr in der Restauration.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

In der 1. Dimension sind im Mangel und auch noch in der Restauration mindestens 3 Banden quantitativ verändert. Diese quantitativen Unterschiede können in der 2. Dimension nicht belegt werden. Entgegen der Erwartung, daß neue Flecken erscheinen oder alte verstärkt angefärbt werden, verschwinden Flecken im Mangel und tauchen erst in der Restauration mit unterschiedlicher Intensität wieder auf. Die Beobachtung, daß ribosomale Proteine im Optimal-Muster im Gel der 1. Dimension verbleiben, im Mangel gänzlich verschwinden und in der Restauration wieder zu sehen sind, induzierte die Möglichkeit, daß diese fraglichen Banden der 1. Dimension in der 2. Dimension zur Anode aus dem Gel auswandern. Die isoelektrischen Punkte dieser Proteine wären also niedriger als pH 4,6. Diese sehr niedrigen iP's könnten durch Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung verursacht werden. Wenn basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin in einzelnen ribosomalen Proteinen fehlen, d. h. das Verhältnis der positiven Ladungen zu den negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten im Protein abnimmt, würde der iP des

Proteins absinken und ihr anionischer Charakter besonders in der 2. Dimension zunehmen. In der ersten Dimension käme dieser Effekt nicht so stark zur Geltung, da die pK-Werte der basischen Aminosäurereste zwischen 10,5 und 12,5 liegen und die ξ -Aminogruppen noch nicht voll protoniert sind. In der 2. Dimension würden sich fehlende positive Ladungen der Seitenketten der basischen Aminosäuren aber stark auswirken. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Proteine aus den verschiedenen Wachstumsphasen könnte über diese Möglichkeit Aufschluß geben.

2.5. Analyse der Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Proteine

Die Analysen brachten überraschende Veränderungen bei 4 Aminosäuren (Tabelle 5). Ribosomale Proteine aus Mangel-Zellen hatten 14 % weniger Thr und Met, 13 % weniger Lys und 15 % weniger Arg, verglichen mit den Werten aus Optimal-Zellen. Der geringere Gehalt an Met, Lys und Arg ist in der Restaurations-Phase wieder aufgehoben, nur der Gehalt an Thr bleibt niedriger.

Diese Ergebnisse können erklären, daß die elektrophoretischen Eigenschaften einiger ribosomaler Proteine aus Mangel-Zellen verändert sind. Besonders der geringere Gehalt an Arginin und Lysin kann sich bei pH 4,6 in der 2. Dimension stark auswirken.

- Tabelle 5 siehe nächste Seite -

Tabelle 5: Aminosäureanalyse der 70S-ribosomalen Proteine aus Optimal-, Mangel- und Restaurations-Zellen

Aminosäure	Optimal	Hunger		Restauration	
	(Mol%)	(Mol%)	Veränderung (%)	(Mol%)	Veränderung (%)
Asp	8,4	9,1	+ 7	8,8	+ 5
Thr	6,3	5,4	- 14	5,5	- 13
Ser	6,4	6,8	+ 6	5,9	- 8
Glu	9,5	9,6	+ 1	9,8	+ 3
Pro	3,3	3,6	+ 9	3,6	+ 9
Gly	8,7	9,2	+ 6	9,0	+ 3
Ala	10,9	11,5	+ 5	11,1	+ 2
Cys	0,2	0,1		0,2	
Val	9,2	9,0	- 2	9,3	+ 1
Met	2,1	1,8	- 14	2,1	0
Ile	5,4	5,6	+ 4	5,4	0
Leu	6,3	6,8	+ 8	6,6	+ 5
Tyr	2,7	2,7	0	2,5	- 7
Phe	2,9	3,1	+ 7	3,0	+ 3
His	1,8	1,7	- 5	1,7	- 5
Lys	8,7	7,6	- 13	8,3	- 5
Arg	7,1	6,0	- 15	6,9	- 3
Trp	0,2	0,2	0	0,2	0

3. Synthese und Einbau ribosomaler Proteine in Ribosomen während der Restaurations-Phase

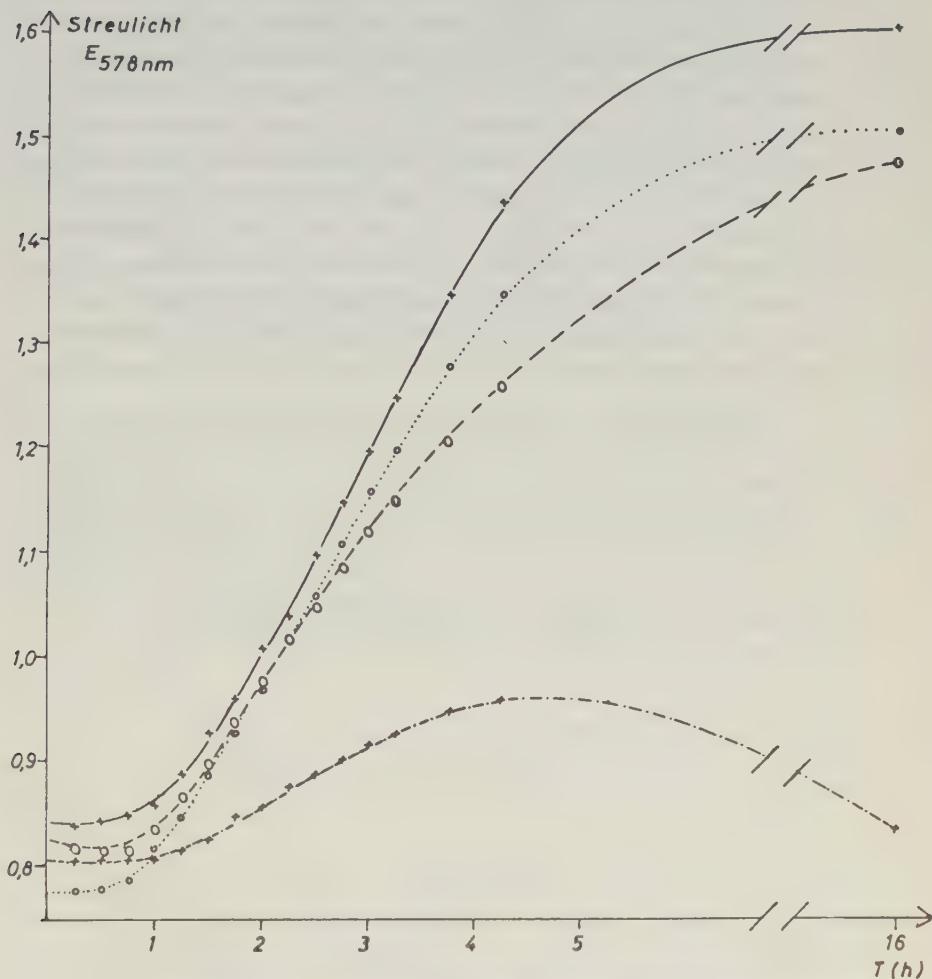
Um die Neusynthese und den Einbau ribosomaler Proteine in Ribosomen nach intensivem Thiamin-Mangel zu verfolgen, wurden *L. viridescens*-Zellen, die mindestens 14 h in thiaminfreiem TAM-Medium inkubiert waren, steril abzentrifugiert und in TAM-Medium mit 100 ng Thiamin/ml und radioaktiv markierten Aminosäuren (^3H -Leu oder ^{14}C -Leu + ^{14}C -Protein-Hydrolysat) 45 Min bei 30 °C belassen und anschließend unter intensiver Kühlung geerntet. Die TAM-Konzentrationen in den Restaurations-Medien waren in 3 Versuchen unterschiedlich: im ersten Versuch wurde TAM nicht verdünnt, im zweiten Versuch war es auf 1/10 und im dritten auf 1/2 der Normalkonzentration mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um einen besseren Einbau markierter Aminosäuren in ribosomale Proteine trotz des hohen Gehaltes an „kalten“ Aminosäuren im Medium zu erhalten (siehe „Material und Methoden“).

3.1. Markierung der ribosomalen Proteine

Die Wachstumskurven von Zellen, die nach 14 h Thiamin-Mangel mit 100 ng Thiamin/ml Medium, aber unterschiedlichen TAM-Konzentrationen wieder wuchsen, sind in Abbildung 26 dargestellt. Je 5 Parallelkulturen wurden in unverdünntem, 2 : 1, 1 : 1 und 1 : 10 verdünntem TAM-Medium inkubiert. Das Wachstum der Kulturen war von der TAM-Konzentration abhängig. Die Menge der Nahrungsstoffe im Medium begrenzt die Wachstumsrate der Zellen. Ausstriche aus den Kulturen (auf APT-Agarplatten bei 30 °C 2 Tage inkubiert) zeigten, daß die Zellen in den drei weniger verdünnten Medien lebensfähig geblieben, die Zellen

aus dem 1 : 10 verdünnten TAM-Medium aber nach 16 h abgestorben waren. Hier wuchsen nur ganz vereinzelt Kolonien.

Abbildung 26: Wachstum von *L. viridescens* nach Thiamin-Mangel mit 100 ng Thiamin/ml und verschiedenen TAM-Konzentrationen



20 *L. viridescens*-Kulturen in Bakterien-Zuchtgläsern wurden nach 14 h Thiamin-Hunger steril abzentrifugiert und je 5 Kulturen in unverdünntem 2 : 1, 1 : 1 und 1 : 10 verdünntem TAM-Medium mit 100 ng Thiamin/ml umgesetzt. Das Wachstum wurde durch Messen des Streulichtes verfolgt.

TAM unverdünnt = + ——— + TAM 2 : 1 verdünnt = o o
TAM 1 : 1 verdünnt = o ——— o TAM 1 : 10 verdünnt = + - - - - +

Die Markierung der ribosomalen Proteine in *L. viridescens* gelingt nur sehr schlecht. In einem 1 : 1 verdünnten TAM-Medium wurden zu 8×10^{12} Zellen (1,15 Streulichteinheiten entsprechend $0,3 \text{ OD}_{578 \text{ nm}}$ entsprechend 10^9 Zellen/ml und 8 l Gesamtvolumen) ^{14}C -Leu ($400 \mu\text{Ci}$ mit 305 mCi/mMol) und ^{14}C -Protein-Hydrolysat ($250 \mu\text{Ci}$ mit 57 mCi/mMol) mit effektiven $7,4 \times 10^8 \text{ cpm}$ gegeben und 45 Min inkubiert. Nach der Sedimentation der Zellen wurden noch $7,1 \times 10^8 \text{ cpm}$ im Medium gefunden. Von den Zellen sind also 4 % der Gesamtaktivität aufgenommen worden. Nach dem Aufschluß der Zellen und der fraktionierten Zentrifugation verblieben im S30-Überstand $2,7 \times 10^6 \text{ cpm}$, das sind rund 10 % der Aktivität, die von den Zellen aus dem Medium aufgenommen wurden. Die S30-Fraktion wurde zur Abtrennung der Roh-Ribosomen hochtourig zentrifugiert; dabei blieben im Überstand (S100) 96 % der Radioaktivität, und nur 4 % ($1,5 \times 10^5 \text{ cpm}$) wurden im Pellet gefunden. Bei der Reinigung der Roh-Ribosomen durch Zentrifugation durch 1 M Saccharose bleiben weitere 90 000 cpm im Zucker zurück und 60 000 cpm an den gereinigten Ribosomen. Diese Aktivität ist auch nach Essigsäurefällung der ribosomalen RNA in der Proteinfraction enthalten:

57 500 cpm bedeuten eine spezifische Aktivität von
3 000 cpm/mg Protein.

3.2. Gradientenzentrifugation der Ribosomen

Ribosomen, die aus Restaurations-Zellen präpariert, mit $0,4 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ gewaschen und bei $3 \times 10^{-4} \text{ M Mg}^{2+}$ dissoziiert waren, wurden auf 9-bis 45%igen Saccharose-Dichtegradienten in die Untereinheiten getrennt. Aliquote Anteile der einzelnen Fraktionen (je 0,5 ml)

wurden in Bray-Scintillator gelöst und die Aktivität gemessen. Abbildung 27 zeigt die Verteilung des optisch absorbierenden Materials und der Radioaktivität im Gradienten.

Ribosomen aus Restaurations-Zellen, die in unverdünntem TAM-Medium 45 Min mit ^3H -Leu inkubiert waren (Abbildung 27 a), zeigen neben 50S- und 30S-Gipfeln UV absorbierendes Material, das langsamer als 30S sedimentiert und bis oben im Gradienten verteilt ist. Wenig Material sedimentiert auch mit etwa 70S vor den 50S-Untereinheiten. 50S- und 30S-Untereinheiten sind etwa im gleichen Maße radioaktiv markiert. Das langsamere sedimentierende Material weist vier flache Aktivitätsbuckel auf, die 70S-Region zeigt besonders hohe spezifische Aktivität (Aktivität/OD).

Abbildung 27 b) zeigt das Ergebnis eines gleichen Versuches, nur „wuchsen“ die Zellen hier in 1 : 10 verdünntem TAM-Medium. Die spezifische Aktivität in 50S-, 30S- und den nächst folgenden beiden Buckeln ist gering. Im Bereich niedriger Sedimentationskonstanten ist jetzt eine hohe Markierung zu finden. Ebenso weist das Material im Bereich von 70S eine sehr hohe spezifische Aktivität auf.

- Abbildungen 27, 27 a) und 27 b) siehe nächste Seite -

Abbildung 27: Gradientenzentrifugation der ribosomalen Untereinheiten aus Restaurations-Zellen

Abbildung 27 a): Restauration in unverdünntem TAM-Medium

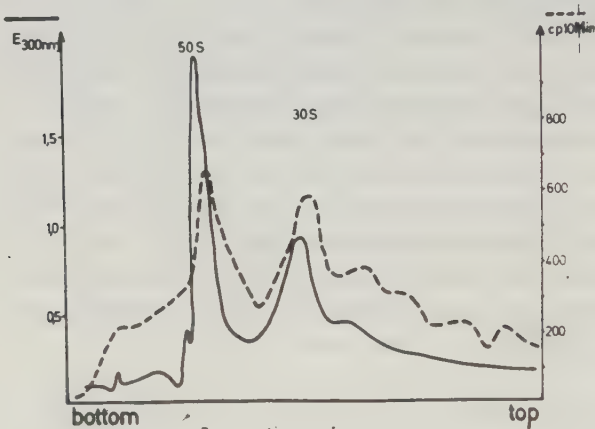
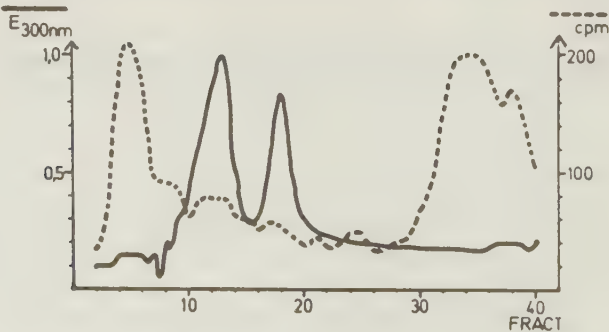


Abbildung 27 b): Restauration in 1 : 10 verdünntem TAM-Medium



Erläuterungen siehe Text. Optische Dichte = —————
Radioaktivität = - - - - -

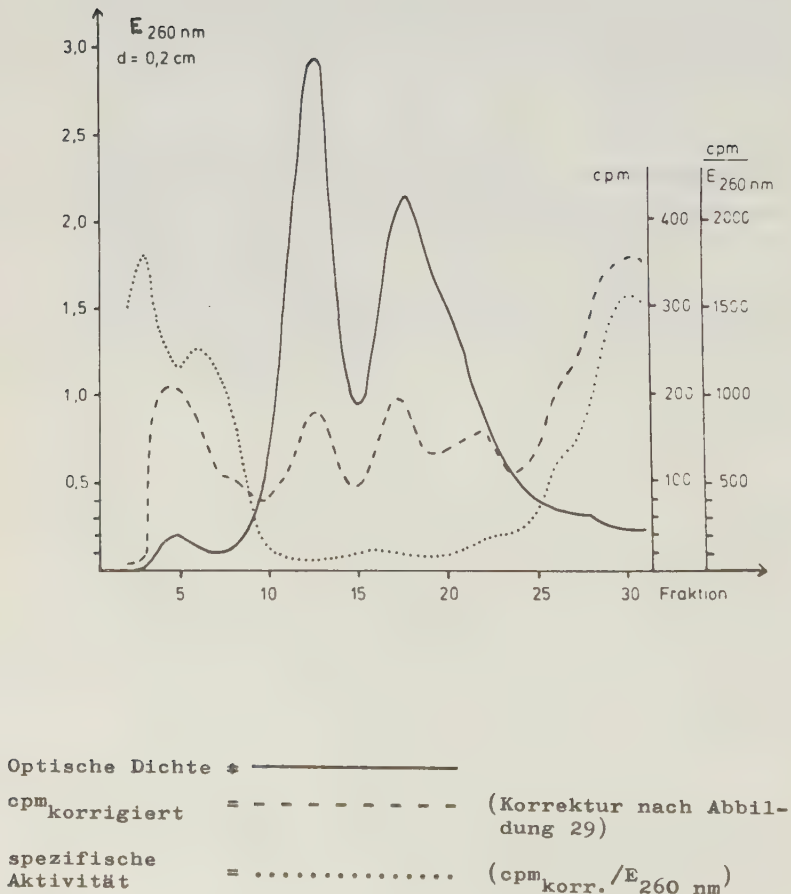
Während der Restauration nach intensivem Thiamin-Mangel werden also ribosomale Proteine neu synthetisiert und in ribosomale Partikel eingebaut. Der Reifungsprozeß der ribosomalen Untereinheiten ist aber wohl in seiner Geschwindigkeit abhängig vom Nahrungsangebot im Medium. Bei optimalen Nährstoffkonzentrationen im Medium sind die ribosomalen Untereinheiten nach 45 Min relativ hoch markiert, während sehr geringe Konzentrationen an Kohlenstoffquellen und (oder) Aminosäuren nur einen Einbau neusynthetisierter ribosomaler Proteine in ribosomale Vorläuferpartikel ermöglichen.

Es fällt auf, daß das schneller sedimentierende Material stark markiert ist. Zwei Möglichkeiten sind denkbar: 1. es handelt sich um einige neusynthetisierte 70S-Ribosomen, die auch bei $10^{-4} \text{ M Mg}^{2+}$ noch nicht dissoziiert sind; 2. es könnten Polysomen sein, die im Präparationsgang mitgeschleppt wurden, die markierte, nicht ribosomale oder ribosomale Proteine im Komplex enthalten. Dieser Proteinbiosynthesekomplex könnte bei $10^{-4} \text{ M Mg}^{2+}$ beständig bleiben.

In einem weiteren Versuch wurden Zellen der Restaurationsphase in 1 : 1 verdünntem TAM-Medium inkubiert. Die Gradientenzentrifugation der ribosomalen Untereinheiten mit der Verteilung der Radioaktivität ist in Abbildung 28 dargestellt. Nach einer Löschkorrektur der cpm (siehe Abbildung 29) ist die spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen als $\text{cpm}_{\text{korrigiert}} / E_{260 \text{ nm}}$ berechnet und eingetragen.

Der Versuch bestätigt, daß die 50S- und 30S-Untereinheiten, wenn auch gering, so doch signifikant markiert sind. Auf dem Gradienten und in den Fraktionen nahe am Boden werden die höchsten Aktivitäten gemessen.

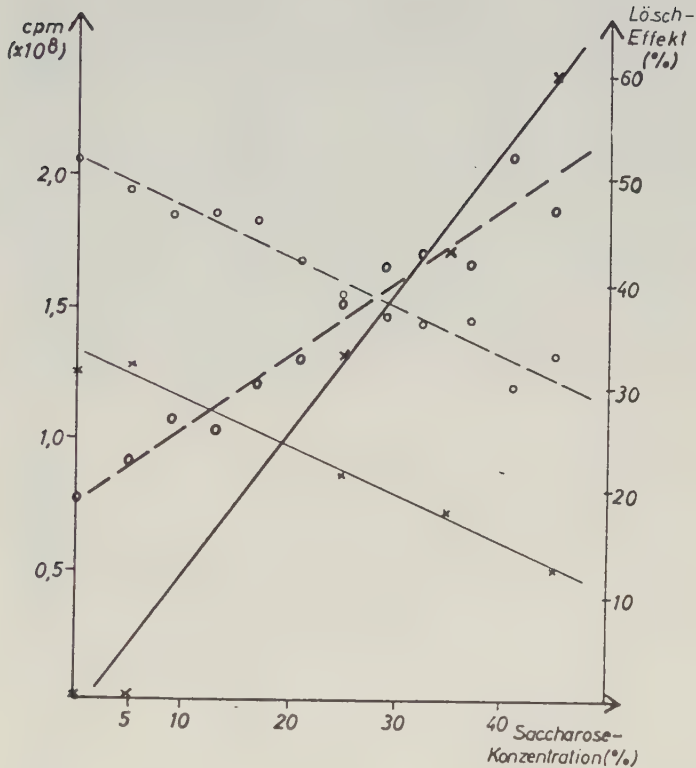
Abbildung 28: Gradientenzentrifugation der ribosomalen Untereinheiten aus Restaurations-Zellen, die in 1 : 1 verdünntem TAM-Medium mit ^{14}C -AS inkubiert waren.

Optische Dichte $\rightarrow$

$\text{cpm}_{\text{korrigiert}}$ = - - - - - (Korrektur nach Abbildung 29)

spezifische Aktivität = (cpm_{korrr.}/E_{260 nm})

Abbildung 29: Lösch-Korrektur für 9- bis 45%ige Saccharose-Dichtegradienten



10 μ l ³H- oder ¹⁴C-Leucin wurden mit 0,5 ml Saccharose-Lösungen in Bray-Scintillator gezählt. Die Zucker-Lösungen waren in D-P angesetzt und dienten der Gradientenbereitung.

Aus den gezählten cpm der inneren Standards sind die Lösch-Grade in % berechnet.

³H-Leu: gefundene cpm = o-----o Lösch-Effekt in % = o-----o

¹⁴C-Leu: gefundene cpm = x-----x Lösch-Effekt in % = x-----x

3.3. Elektrophoretische Trennung der ribosomalen Proteine

Ribosomale Proteine der gereinigten 70S-Ribosomen aus Restaurations-Zellen, die in 1 : 1 verdünntem TAM-Medium mit 100 ng Thiamin/ml und ^{14}C -Leu + ^{14}C -Protein-Hydrolysat inkubiert waren, wurden in der 1. und 2. Dimension aufgetrennt. Die Banden der 1. Dimension wurden gefärbt, densitometrisch registriert, in 2 mm dicke Scheiben geschnitten, die Aktivität mit je 0,5 ml Soluene (12 h bei 60 °C) extrahiert und gezählt (siehe „Material und Methoden“). Gelplatten der 2. Dimension wurden ebenfalls gefärbt, gezeichnet und photographiert, die Flecken ausgestochen, die Gelstücke (rund 200 mg Feuchtgewicht) mit 1,0 ml Soluene 12 h bei 60 °C inkubiert (siehe Tabelle 6) und die Proben in Toluol-Scintillator gezählt.

Die Banden der ersten Dimension bzw. die Flecken in den Platten der zweiten Dimension sind unterschiedlich stark mit Amidoschwarz angefärbt. Dadurch wird auch der Scintillator verschieden stark gefärbt. Die Zählausbeuten hängen daher nicht allein von der Extraktionsmethode, sondern auch vom Färbungsgrad der Proben ab. So können die gemessenen Aktivitäten nicht zu quantitativen Betrachtungen herangezogen werden. Es ist nur möglich zu entscheiden, ob ribosomale Proteine in der Restaurations-Phase markiert und damit neu synthetisiert und eingebaut werden oder nicht. Für quantitative Aussagen wäre eine Verbrennung der Gelstücke und das Auffangen des $^{14}\text{CO}_2$ (bzw. $^3\text{H}_2\text{O}$) notwendig. Die apparativen Voraussetzungen hierfür fehlen leider.

Tabelle 6: Extraktion radioaktiv markierter Polypeptide aus Acrylamidgelen der 1. und 2. Dimension

In vitro synthetisiertes Poly-Phe wurde in 4%ige und 18%ige Acrylamidgele einpolymerisiert und verschiedenen Extraktionsmethoden unterworfen (siehe „Material und Methoden“). Die Proben wurden in Toluol-Scintillator gezählt.

Lösungs- Mittel	Vol. (ml)	Temp. (°C)	Inkub. Zeit (h)	Aus		
				4%igen	Gelen extrahierte Aktivität (%)	18%igen (%)
L e e r w e r t						
Soluene	0,5	20	12	10 000	100	64 500 100
"	1,0	20	12	8 100	81	
"	0,5	60	12	9 850	98,5	50 600 78,5
"	1,0	60	12			55 750 86
H ₂ O ₂	0,3	60	12			
+ Soluene	0,2	--	--	3 050	30,5	
H ₂ O ₂	0,5	60	12			
+ Soluene	0,5	--	--			30 750 47,5
NH ₄ + OH ⁻	0,5	37	12			
+ Soluene	0,5	--	--	8 950	89,5	
NH ₄ + OH ⁻	1,0	37	12			39 000 52,5
+ Soluene	1,0	--	--			
Dimethyl- sulfoxid	0,5	37	12	1 450	14,5	8 050 12,5

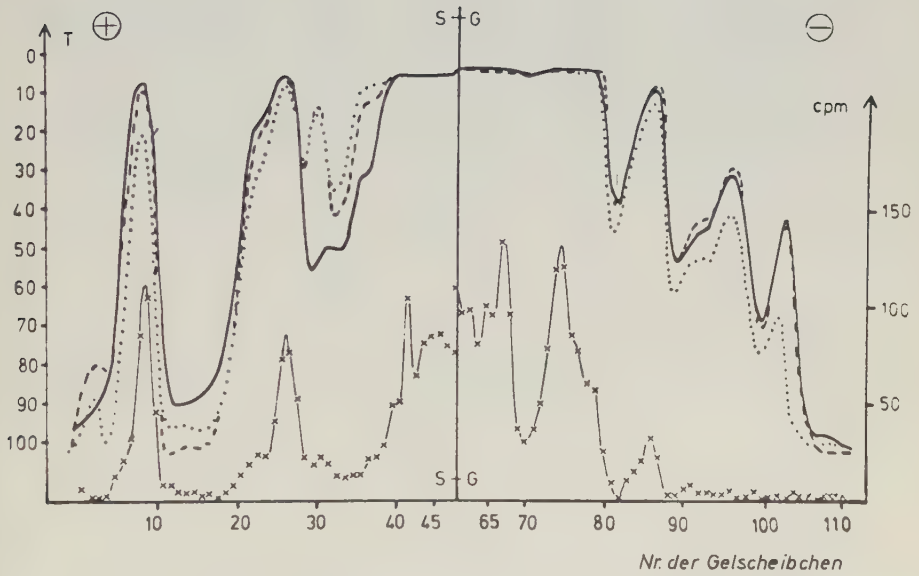
Als effektivste Extraktionsmethode erwies sich die Inkubation mit Soluene (Packard) über 12 h bei 60 °C. Werden die Gele mit dem einpolymerisierten Poly-Phe durch Amido-schwarz angefärbt und anschließend durch 7%ige Essigsäure teilweise entfärbt, so können noch 50 % der eingesetzten cpm extrahiert und gemessen werden.

Abbildung 30 zeigt die densitometrischen Kurven der 3 Gele der 1. Dimension, in denen die ribosomalen Proteine der gereinigten 70S-Ribosomen aus Optimal-, Mangel- und Restaurations-Zellen getrennt wurden. Die registrierten Transmissionen der Amidoschwarz gefärbten Banden stellen noch einmal die unterschiedlichen Bandenmuster der ribosomalen Proteine der drei untersuchten Wachstums-Phasen dar (siehe hierzu Abbildung 22). In einer vierten Kurve wurden die Aktivitäten eingetragen, die im eindimensionalen Gel der ribosomalen Proteine aus Restaurations-Zellen gefunden worden waren. Die Verteilung der Radioaktivität deutet an, daß zahlreiche, aber nicht alle ribosomalen Proteine während einer 45minütigen Restauration nach Thiamin-Mangel neu synthetisiert und in Ribosomen eingebaut werden.

Die Untersuchung der Markierung der einzelnen Flecken im zweidimensionalen Muster der ribosomalen Proteine aus Restaurations-Zellen gibt Aufschluß darüber, welche Proteine im einzelnen neu synthetisiert und in Ribosomen eingebaut werden. Tabelle 7 zeigt, daß 7 der 30S-ribosomalen Proteine und 20 der 50S-ribosomalen Proteine signifikant markiert sind.

- Abbildung 30 siehe nächste Seite -

Abbildung 30: Verteilung der Radioaktivität im Gel der 1. Dimension, in dem ribosomale Proteine aus Restaurations-Zellen getrennt wurden



Transmissionen der Gele mit Protein
aus Optimal-Zellen = —————

Mangel-Zellen =

Restaurations-Zellen = - - - - -

gemessene Aktivität = x ————— xx

Tabelle 7: Synthese ribosomaler Proteine und Einbau
in Ribosomen während einer 45minütigen
Restaurations-Phase nach Thiamin-Mangel

S1 +	S11 +	L1 +	L11 -	L21 -	L31 -
S2 +	S12 +	L2 -	L12 +	L22 +	L32 -
S3 +	S13 -	L3 +	L13 +	L23 +	L33 -
S4 +	S14 -	L4 +	L14 +	L24 -	L34 -
S5 -	S15 -	L5 +	L15 +	L25 -	L35 -
S6 -	S16 -	L6 +	L16 +	L26 -	L36 -
S7 -	S17 -	L7 +	L17 +	L27 -	L37 -
S8 +	S18 -	L8 +	L18 +	L28 +	L38 +
S9 -	S19 -	L9 +	L19 -	L29 -	L39 -
S10 -	S20 -	L10 -	L20 +	L30 -	L40 -

+ = es konnte Aktivität in den Flecken gefunden wurden

- = hier wurde keine Markierung gemessen.

Aus der Verteilung der neusynthetisierten und eingebau-
ten ribosomalen Proteine im zweidimensionalen Muster kann
leider nicht gesagt werden, ob es sich hierbei um solche
handelt, die beim Zusammenbau der Ribosomen als erste an
die ribosomale RNA anlagern oder ob sie erst später an
ribosomale Partikel gebunden werden.

D. Diskussion

Die Ribosomen von *Lactobacillus viridescens* wurden aus mit Thiamin gewachsenen Zellen, aus Mangel-Keimen und aus Keimen in der Restauration vom Thiamin-Mangel untersucht.

Mit einem modifizierten Saccharose-Dichtegradienten wurden die ribosomalen Untereinheiten voneinander getrennt. Die Elution der Gradienten wurde automatisiert. Die ribosomalen Proteine wurden mit der modifizierten zweidimensionalen Acrylamid-Elektrophorese-Technik⁵²⁾ analysiert. Das Muster der ribosomalen Proteine von *L. viridescens* (Wachstum mit Thiamin) wurde mit dem Muster der ribosomalen Proteine aus *E. coli* verglichen.

Die Muster sind verschieden. *L. viridescens* besitzt mehr ribosomale Proteine mit einem isoelektrischen Punkt unter pH 8,6. Nur 20 % der gesamten ribosomalen Proteine beider Stämme zeigen gleiche elektrophoretische Mobilität.

Ribosomen, ribosomale RNA und ribosomale Proteine aus Thiamin-Mangel-Zellen zeigten Veränderungen:

1. Der Ribosomengehalt ist in Mangel-Zellen erniedrigt.
2. Bei 10^{-4} M Mg^{2+} ist die Sedimentation der ribosomalen Untereinheiten unverändert.
3. Die Mangel-Ribosomen enthalten aufgrund optischer Messungen mehr ribosomales Protein als Ribosomen aus Optimal-Zellen. Die höhere Ausbeute könnte durch einen hypochromen Effekt vorgetäuscht werden, bedingt durch Konformationsänderung der ribosomalen RNA.
4. Nach Essigsäurefällung der ribosomalen RNA zeigt die elektrophoretische Analyse Ribonucleoprotein-Partikel, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

5. Der Gehalt an Threonin, Methionin, Lysin und Arginin ist im ribosomalen Proteingemisch signifikant verringert.
6. Einige wenige ribosomale Proteine zeigen andere elektrische Beweglichkeiten, diese beruhen auf veränderten isoelektrischen Punkten.

Die Untersuchungen an Ribosomen aus Restaurations-Zellen brachten folgende Ergebnisse:

7. Der Ribosomengehalt steigt wieder an, erreicht aber noch keine optimalen Werte.
8. In Saccharose-Dichtegradienten sedimentieren die ribosomalen Untereinheiten bei 10^{-4} M Mg^{2+} etwas langsamer als die Untereinheiten aus Optimal- und Mangel-Zellen.
9. Die Ausbeute an ribosomalem Protein erreicht Normalwerte.
10. Ribonucleoprotein-Partikel können nach Essigsäurefällung der ribosomalen RNA kaum noch gefunden werden.
11. Die im Thiamin-Mangel verminderten Gehalte der Ribosomenproteine an Threonin, Methionin, Lysin und Arginin erreichen außer bei Threonin wieder die Werte für Ribosomenproteine aus Optimal-Zellen.
12. Die ribosomalen Proteine zeigen kaum noch veränderte elektrophoretische Beweglichkeiten.
13. Es werden einige, aber nicht alle ribosomalen Proteine neu synthetisiert und in Ribosomen-Partikel eingebaut.
14. Die neusynthetisierten und eingebauten ribosomalen Proteine werden in ribosomalen Vorläufer-Partikeln, ribosomalen 30S- und 50S-Untereinheiten und in höher molekularen Partikeln (70S-Ribosomen, 100S-dimere Ribosomen oder polymere Ribosomen) gefunden.
15. Die neusynthetisierten und eingebauten ribosomalen Proteine sind im elektrophoretischen Muster zu identifizieren und heterogen verteilt.

1. Die ribosomalen Proteine aus *Lactobacillus viridescens* im Vergleich zu ribosomalen Proteinen aus *Escherichia coli*

Die Struktur der Ribosomen wurde bisher besonders intensiv bei *E. coli* untersucht (Überblick siehe ⁶⁴⁾). Seit *W a l l e r* die ersten analytischen Arbeiten über ribosomale Proteine veröffentlichte ¹²¹⁾, fanden diese immer größeres Interesse. Für die ribosomalen Proteine aus *E. coli* wurde eine Nomenklatur vorgeschlagen ⁵⁵⁾, die für 30S-Proteine allgemein akzeptiert ist ¹²⁵⁾ und für 50S-Proteine bald auch gültig sein wird. Die Nomenklatur beruht auf der Identifizierung der ribosomalen Proteine in der analytischen zweidimensionalen Acrylamidgel-Elektrophorese ⁵²⁾, in der jedes ribosomale Protein als ein distinkter Fleck erscheint, falls nicht zwei Proteine gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen ⁵⁵⁾. Für die ribosomalen Proteine aus der selben Untereinheit konnte das aber bisher nicht beobachtet werden. Bei *E. coli* bilden S20 und L26 im 70S-Muster einen gemeinsamen Fleck ⁵⁵⁾. Sie besitzen aber unterschiedliche Molekulargewichte ^{17, 28, 119)}, Aminosäurezusammensetzung ⁵³⁾, Peptid-Muster ^{92, 127)} und sind immunologisch nicht ähnlich ^{111, 112)}. Daher haben S8 und L19 aus *L. viridescens*, die im 70S-Muster einen gemeinsamen Fleck ergeben, wahrscheinlich auch verschiedene Primärstrukturen.

Es ist überhaupt anzunehmen, daß etliche allgemeine Aussagen, die für ribosomale Proteine aus *E. coli* gewonnen wurden, auch für ribosomale Proteine aus *L. viridescens* gelten. So liegen die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine aus *E. coli* zwischen knapp 10 000 und rund 65 000 ^{28, 119)}. S1 wandert als größtes Protein nur in der ersten Dimension, in der zweiten dagegen kaum. L34 als kleinstes Protein wandert sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension am weitesten ⁵⁵⁾. Die Molekulargewichte sind bei entsprechenden

L. viridescens ribosomalen Proteinen sicher ähnlich. S1 und S2 wandern auch hier in der 2. Dimension nicht weit, während L39 und L40 bei 18%igem Acrylamid in der 2. Dimension in der Pufferfront verbleiben und erst bei höherer Vernetzung des Gels zu trennen sind.

Die isoelektrischen Punkte der ribosomalen Proteine aus *E. coli* liegen zwischen pH 4,7 und über pH 12^{56, 123}). Auch hier dürften die ribosomalen Proteine ähnliche Werte besitzen. Allerdings wandern L1 und L6 weiter zur Anode (in der ersten Dimension) und einige Proteinflecken scheinen in der 2. Dimension bei pH 4,6 anodisch zu wandern (z. B. L1). Auch besitzt *L. viridescens* zahlreichere ribosomale Proteine, mit einem isoelektrischen Punkt, niedriger als pH 8,6 (i.e. *L. viridescens*: 6 aus der 30S- und 10 aus der 50S-Untereinheit; *E. coli*: 4 aus der 30S- und 7 aus der 50S-Untereinheit). Die isoelektrischen Punkte der ribosomalen Proteine aus *Streptococcus faecalis* sind ähnlich verteilt wie bei *E. coli*⁹⁾, nur extrem halophile Bakterien besitzen ribosomale Proteine mit isoelektrischen Punkten von meist pH 3,9 und wenig über pH 8,5³⁾.

Die Analysen der Aminosäurezusammensetzungen der 70S-Proteine lieferten den Hinweis, daß die ribosomalen Proteine von *L. viridescens* und *E. coli* in der Elektrophorese unterschiedlich wandern könnten. So werden in beiden zwidimensionalen Mustern auch nur 20 % gleiche Positionen gefunden. Die übrigen ribosomalen Proteine der beiden Stämme verhalten sich alle ungleich. Das ist verständlich, da *E. coli* und *L. viridescens* verschiedenen Familien angehören⁹⁴⁾. Die ribosomalen Proteine der bisher untersuchten Bakterien unterscheiden sich von verwandten Arten je nach dem Grad der Verwandtschaft (54, 83, 84, 126, 128).

2. Veränderungen an Ribosomen durch Thiamin-Mangel

Der Ribosomengehalt in Mangel-Zellen ist erniedrigt. Dieser Befund ist nicht beschränkt auf *L. viridescens*. Nach intensivem Thiamin-Mangel ist auch in Organen (z. B. Herz) thiamingehungerter Ratten der Ribosomengehalt vermindert¹²⁹⁾. In *E. coli* tritt außerdem nach Phosphat-⁶⁹⁾ oder nach Mg^{2+} -Mangel^{10, 113, 122)} das gleiche Phänomen auf.

Julien, Kersten und Hess⁴⁹⁾ hatten beobachtet, daß Ribosomen aus Mangel-Zellen bei $10^{-2}M Mg^{2+}$ im Saccharose-Dichtegradienten mit 60S sedimentieren, die ribosomalen Untereinheiten dieser Partikel bei $10^{-4}M Mg^{2+}$ aber exakt bei 50S und 30S. Diese Beobachtung wird in dieser Arbeit bestätigt. Das gleiche Sedimentationsverhalten der Untereinheiten aus 60S- und 70S-Ribosomen bei $10^{-4}M Mg^{2+}$ kann dadurch erklärt werden, daß die beiden Untereinheiten im 60S- und im 70S-Partikel bei $10^{-2}M Mg^{2+}$ unterschiedlich assoziiert oder gefaltet sind. Weitere Hinweise für eine veränderte Assoziation von ribosomaler RNA und ribosomalen Proteinen in Mangel-Ribosomen sind die Befunde, daß sich die RNA durch Behandlung mit Essigsäure nicht vollständig vom Protein abtrennen ließ. Es traten Ribonucleoprotein-Partikel auf, von denen auch durch Behandlung mit Phenol die Proteine nicht völlig abdissoziiert wurden. Diese Ergebnisse können bedeuten: unter Thiamin-Mangelbedingungen werden die Ribosomen so verändert, daß die Bindungskräfte zwischen der RNA und den ribosomalen Proteinen im Ribosom modifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß während des Mangels bestimmte funktionelle Ribosomenproteine abgespalten und während der Aufarbeitung nicht ribosomale basische Proteine unspezifisch assoziieren und dann nicht mehr unter den gewählten Bedingungen von der RNA abzuspalten sind. Diese unspezifische

Anlagerung von Zellproteinen an ribosomale Partikel wurde bei sogenannten „Chloramphenicol-Partikeln“^{44, 80)} beobachtet. Diese entstehen unter Einfluß von Chloramphenicol - einem Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese durch Wirkung auf die 50S-Untereinheit hemmt - in Bakterienzellen. Sie sind unvollständige Ribosomen, die mit Fremdproteinen während der Aufarbeitung assoziieren^{96, 130)}.

Die Bindungskräfte zwischen RNA und Protein sind im Ribosom bevorzugt hydrophober Natur¹⁰⁸⁾, wobei den Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Histidin eine besondere Rolle zukommt⁸⁹⁾. Darüber hinaus sind Mg^{2+} -Ionen wichtig für die Aufrechterhaltung der Ribosomenstruktur, da sie die negativen Ladungen der RNA-Phosphatgruppen neutralisieren⁸⁷⁾. Es wäre daher denkbar, daß während des Thiamin-Mangels Veränderungen auftreten, die diese Bindungskräfte beeinflussen.

Die Aminosäureanalyse zeigte, daß die ribosomalen Proteine aus Mangel-Zellen weniger Threonin, Methionin, Arginin und Lysin enthalten. Diese Veränderung kann 1. durch Austausch ursprünglich ribosomaler Proteine gegen Proteine aus dem Zellüberstand oder 2. durch teilweise enzymatischen Abbau einiger ribosomaler Proteine selbst hervorgerufen werden.

Der Gehalt an Lysin + Arginin beträgt in ribosomalen Proteinen aus *E. coli* 13,5 Mol% (= S1) bis 24,3 Mol% (= S21)¹⁷⁾. Ein niedrigerer Gehalt an Arginin und Lysin würde bei pH 4,6 einen geringeren kationischen Charakter der Proteine begründen. Dadurch könnte erklärt werden, daß einige Proteine der Mangel-Ribosomen, die in der ersten Dimension verstärkte Banden bilden, in der zweiten Dimension nicht mehr gefunden werden, weil sie bei pH 4,6 nicht als Kationen in das Gel einwandern, sondern als Anionen nach oben die Gelplatte verlassen. Die geringfügig verlangsamte Wanderung der Proteine S10, L6 und L40 in der zweiten Dimension könnte ebenfalls

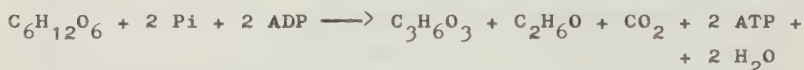
darauf beruhen, daß ihnen ein Arginin- oder ein Lysin-Rest fehlt. Die Proteine S3 und S17 wandern in der zweiten Dimension dagegen schneller. Es ist möglich, daß sie zum Teil durch Proteasen abgebaut sind und daher ein etwas geringeres Molekulargewicht haben. Anstelle des Proteins L7 zeigen sich im Mangel drei Flecken. Das Protein L11 ist im Mangel deutlich stärker angefärbt. Aus der Literatur ist bekannt, daß in unterschiedlichen Wachstumszuständen einige ribosomale Proteine in verschiedenen Konzentrationen am Ribosom vorkommen²⁵⁾. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit bestimmter Proteine und das Auftreten neuer Flecken kann demnach auch auf die Heterogenität der Ribosomen in verschiedenen physiologischen Zuständen zurückgeführt werden.

Die modifizierten Ribosomen aus Thiamin-Mangel-Keimen sind im Proteinbiosynthese-System (in vitro) inaktiv^{49, 67)} und damit unvollständig oder geschädigt. Auf welche Ursachen die durch Thiamin-Mangel bedingten Veränderungen am Ribosom zurückzuführen sind, bleibt offen.

Veränderungen der Ribosomen durch Mangelzustände sind artverschieden⁷⁸⁾. So weisen Ribosomen aus *E. coli* in Mg^{2+} -gehinderten Zellen niedrigere Sedimentationswerte auf, ohne daß RNA abgebaut wird¹⁰⁾. Auch Ribosomen aus Zellen (*E. coli*), die ohne jegliche Nährstoffe inkubiert waren, sedimentieren im Gradienten langsamer⁷⁰⁾. Da Mg^{2+} die Konformation der Ribosomen und ihre Funktion entscheidend beeinflusst^{29, 32, 34, 41, 72, 82, 116, 120, 132)}, kann angenommen werden, daß eine Modifikation der Ribosomen durch veränderte Mg^{2+} -Konzentration in der Zelle entscheidende Auswirkungen in der Proteinbiosynthese hat.

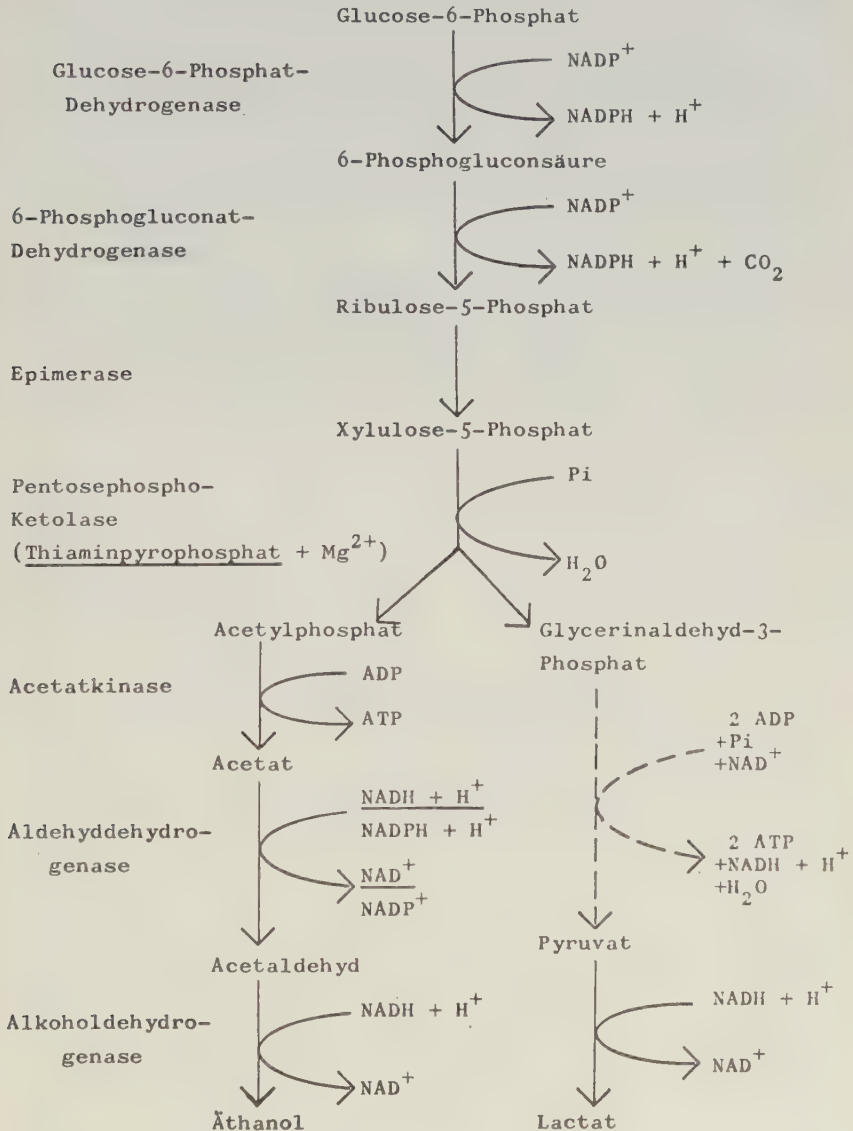
Lactobacillen besitzen keine Cytochrome und können daher die in der Glycolyse anfallenden Reduktionsäquivalente nur durch Reduktion der glycolytischen Produkte reoxidieren.

L. viridescens, ein heterofermentatives Milchsäurebakterium⁹⁴⁾, hat keine Aldolase oder Triosephosphat-Isomerase, um Glucose über Fructose-1,6-Diphosphat in die Glycolyse einzuschleusen. Daher wird Glucose-6-Phosphat über 6-Phosphogluconsäure unter Freisetzung von CO_2 in Ribulose-5-Phosphat oxidiert und durch eine Epimerase in Xylulose-5-Phosphat umgewandelt. Diese Pentose wird unter Aktivierung eines anorganischen Phosphats und Abspaltung von H_2O durch eine thiaminabhängige Pentosephospho-Ketolase in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetylphosphat gespalten⁶²⁾ (siehe Schema 1). Erst nach dieser Reaktion, die Thiamin als Coenzym unbedingt benötigt, kann Energie in Form von ATP gewonnen werden. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird über die normale Glycolyse zum Pyruvat oxidiert und dann zum Lactat reduziert. Acetylphosphat kann bis zum Äthanol reduziert werden. Die Zusammenfassung des Glucose-Abbaus durch heterofermentative Milchsäuregärung in *L. viridescens* lautet:



Die gesamte Energiegewinnung in *L. viridescens* hängt also von der thiaminabhängigen Pentosephospho-Ketolase ab. Im Thiamin-Mangel kann keine Energie gewonnen werden. So werden alle energieverbrauchenden Schritte in der Zelle gestoppt. Die RNA- und Protein-Synthesen unterbleiben. Außerdem werden aber auch membrangebundene, energieverbrauchende Prozesse unterbrochen. So ist es denkbar, daß die Mg^{2+} -Konzentration in der Zelle gegen ein Gefälle zum Medium durch entsprechende membrangebundene Prozesse aufrechterhalten wird. Werden diese Transportfunktionen durch mangelnde Energiezufuhr gestoppt, so kann Mg^{2+} aus den Zellen ausfließen. Die Ribosomen würden dann bei geringerer Mg^{2+} -Konzentration ihre Konformation ändern und funktionsunfähig.

Schema 1: Heterofermentative Milchsäuregärung:
(nach Schlegel⁹⁴⁾ und Krampitz⁶²⁾)



Diese Gedankengänge gehen zurück auf Webb, der zeigte, daß gram-negative Zellen im Mg^{2+} -Hunger die Mg^{2+} -Ionen aktiv in der Zelle festhalten können, gram-positive Keime aber nicht. Bei ihnen fließen die Mg^{2+} -Ionen aus¹²²⁾. Lactobacillen sind gram-positiv.

Da die Auswirkungen des Thiamin-Mangels mit denen des Mg^{2+} -Mangels^{13, 113)} zu vergleichen sind, ist es denkbar, daß durch den Mangel an Thiamin ein Mangel an Mg^{2+} hervorgerufen wird. Dieser Mg^{2+} -Mangel könnte die Veränderungen an den Ribosomen in *L. viridescens* erklären. Die Hypothese erhält Unterstützung durch Untersuchungen von B o h n e und K e r s t e n⁶⁾ und B ö c k e r et al.⁵⁾, die in Thiaminmangel-Keimen charakteristische Veränderungen im Stoffwechsel von Zellwandbausteinen fanden.

3. Synthese und Einbau ribosomaler Proteine in ribosomale Partikel während der Restauration

Die Veränderungen, die der intensive Thiamin-Mangel an Ribosomen in *L. viridescens* bewirkt, werden während der 45minütigen Restaurations-Phase fast vollständig wieder aufgehoben. Allerdings sedimentieren die Untereinheiten aus Restaurations-Zellen bei 10^{-4} M Mg^{2+} im Gradienten langsamer.

Es konnte gezeigt werden, daß während der Restauration ribosomale Proteine synthetisiert und in Ribosomen eingebaut werden. Die 16S- und 23S-RNA werden während der Restauration neu synthetisiert und in Ribosomen im Verhältnis 1 : 1 (30S zu 50S) gefunden⁵⁹⁾. Die Markierung der ribosomalen Untereinheiten durch neu synthetisiertes und eingebautes ribosomales Protein beträgt ebenfalls 1 : 1⁶⁶⁾. Da das Molekulargewicht der 30S-Ribosomen nur halb so groß wie das der 50S-Ribosomen und die optische Dichte in den Gradienten wie 1 : 2 verteilt ist, muß angenommen werden, daß 30S-Untereinheiten bevorzugt synthetisiert werden.

Die 16S-RNA wird vor der 23S-RNA transkribiert⁶¹⁾ und benötigt nur knapp die halbe Synthesezeit²⁾. 16S-RNA-Vorläufer¹⁴⁾ sind generell zahlreicher in der Zelle vorhanden als 23S-Vorläufer. Die 23S-RNA-Vorläufer werden nach der Synthese mehr in Polysomen, die 16S-RNA-Vorläufer dagegen mehr in ribosomalen Untereinheiten gefunden¹⁹⁾.

Die Synthese der ribosomalen Proteine erfolgt in der Regel am Proteinsynthese-Komplex der Polysomen^{31, 65)} und benötigt für 1 Protein nur wenige Sekunden⁹⁵⁾. Es werden auch noch andere bisher unbekannte Synthesewege für Ribosomen diskutiert⁴⁷⁾, die für die Neusynthese ribosomaler Proteine

nach Degradation der Ribosomen durch Mangel-Zustände wichtig sein könnten. Neusynthetisierte ribosomale Proteine werden sehr schnell in ribosomale Vorläufer-Partikel eingebaut³³⁾. Sie werden auch nicht im „ribosomalen Protein-Pool“ gesammelt, da dieser sehr klein ist und seine Größe nicht stark ändert^{33, 38, 68)}. Sie binden bevorzugt an einsträngige RNA⁷⁵⁾, schützen die ribosomale RNA vor Nukleasen¹⁰⁵⁾ und verändern die Konformation der ribosomalen RNA¹¹⁴⁾. Die Reihenfolge des Zusammenbaus der ribosomalen Partikel ist genau festgelegt und als Information in den Einzelkomponenten (RNA und Proteine) vorhanden^{39, 46, 73, 81, 88, 117, 118)}. Verschiedene ribosomale Proteine werden unterschiedlich schnell synthetisiert¹⁰²⁾ und binden in unterschiedlicher Reihenfolge an RNA¹⁵⁾. Die Neusynthese der ribosomalen Proteine und ihr Einbau in ribosomale Partikel ist also durch verschiedene unbekannte Faktoren reguliert.

Die Synthese und der Einbau werden aber in der Restauration nach Mangelzuständen anders ablaufen als im normalen Wachstum. Bei ungestörtem Wachstum und optimalem Nahrungsangebot werden ribosomale Proteine in vorhandenen Ribosomen kaum ausgetauscht⁵⁰⁾. Die kleinste Halbwertszeit haben die „split“-Proteine, die mit hohen Salzkonzentrationen vom Ribosom abgelöst werden können²²⁾. Diese Proteine sitzen außen am Ribosom, können durch Trypsin angegriffen werden und werden bei der Rekonstitution als letzte an ribosomale Partikel angelagert^{11, 99)}. Außer den fertigen und vollständigen Ribosomen sind in der Zelle aber auch ribosomale Vorläufer mit geringerem Proteingehalt⁴³⁾ und erniedrigten Sedimentationskonstanten in Gradienten⁵⁸⁾ zu finden.

Nach Hemmung der Proteinbiosynthese durch Chloramphenicol^{20, 100, 130, 131)} oder Puromycin¹⁰¹⁾ oder durch Aminosäure-Mangel^{21, 23, 35, 45, 76, 110, 133)} werden in der Restauration einige ribosomale Proteine bevorzugt synthetisiert und eingebaut. Es sind dies besonders die „split“-Proteine, die vorhandene ribosomale Partikel komplettieren und funktionsfähig machen.

Während der Restauration nach Thiamin-Mangel werden ebenfalls bevorzugt einige ribosomale Proteine synthetisiert⁵⁹⁾ und eingebaut. Da längst nicht alle ribosomalen Proteine markiert sind, Aktivität aber in allen Ribosomenpartikeln gefunden wird, kann nicht entschieden werden, ob neusynthetisierte ribosomale Proteine nur in neu gebildete Ribosomen oder auch in schon vorhandene ribosomale Partikel eingebaut werden. Es ist möglich, daß neusynthetisierte und schon fertige ribosomale Untereinheiten mit alten 50S- und 30S-Partikeln im Gradienten zusammen sedimentieren. Außerdem können ribosomale Vorläufer-Partikel während der Gradienten-Zentrifugation von Untereinheiten abgetrennt werden, die langsamer sedimentieren oder spezifisch höher markiert sind. Sie enthalten neusynthetisierte ribosomale Proteine. Es ist sehr fraglich, ob diese neuen ribosomalen Proteine der Vorläufer-Partikel auch in der elektrophoretischen Analyse enthalten sind, da bei der Reinigung der Roh-Ribosomen durch 1 M Saccharose 60 % der Aktivität und 30 % des optischen Materials verloren gehen. Trotz 9stündiger Zentrifugation bei 190 000 g wird ein großer Teil der Vorläufer wahrscheinlich nicht sedimentieren, sondern im Überstand bleiben.

Auf der anderen Seite wurde spezifisch sehr hoch markiertes „70S“-Material aus den Restaurations-Zellen gewonnen und identifiziert. Dieses Material könnten Polysomen sein; sie müßten allerdings bei 10^{-4} M Mg^{2+} beständig bleiben. Es kann in der Literatur aber kein Beispiel gefunden werden, daß bei so niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen Polysomen im Gradienten abzutrennen sind^{82, 106)}. Eine andere Möglichkeit wären neusynthetisierte 70S-Ribosomen, die hoch spezifisch markiert wären und vor den 50S-Untereinheiten sedimentieren. Die Dissoziation der Ribosomen in die Untereinheiten wird auch von der Bindung an Messenger-RNA oder acylierte Transfer-RNA beeinflusst⁴⁾. So finden D u i n et al.²⁷⁾ bei $1,5 \times 10^{-3}$ M Mg^{2+} im Gradienten

hohe spezifische Aktivität über einem 70S-Gipfel nach Inkubation der Ribosomen mit S100, viralem Messenger und ^{14}C -Aminosäuregemisch. Bei $5 \times 10^{-4} \text{ M Mg}^{2+}$ verschwinden aber dieser Gipfel und die Aktivität. Die Autoren glauben, daß der 70S-Gipfel durch anhaftende ^{14}C -Aminosäure-acyl-t RNA so hoch markiert ist. Bei $3 \times 10^{-4} \text{ M Mg}^{2+}$ wurde aber bisher noch kein 70S-Material im Gradienten identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit können noch keinen Aufschluß über die Natur des „70S“-Materials geben. J u l i e n et al.⁴⁹⁾ fanden in der Restaurations-Phase 70S-Ribosomen, die sich von den 60S-Ribosomen durch Gradienten-Zentrifugation abtrennen konnten. Diese 70S-Ribosomen waren in der zellfreien Proteinbiosynthese hoch aktiv. Die 70S-Ribosomen sind wahrscheinlich während der Restauration neu synthetisiert, die 60S-Ribosomen stammen noch aus der Thiamin-Mangel-Phase.

Die neusynthetisierten und in ribosomale Partikel eingebauten Proteine, die an gereinigten Ribosomen verbleiben und in der Elektrophorese identifiziert werden, sind wahrscheinlich „split“-Proteine, die an unvollständige Ribosomen aus Mangel-Zellen anlagern und diese komplettieren.

E. Zusammenfassung

Die Ribosomen und ribosomalen Proteine aus *Lactobacillus viridescens*, einem Thiamin-auxotrophen Bakterium, wurden präpariert und analysiert.

Das Muster der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens*-Zellen, die bei optimalen Thiamin-Konzentrationen gewachsen waren, konnte zum erstenmal in der zweidimensionalen Acrylamidgel-Elektrophorese bestimmt und jedes einzelne Protein den ribosomalen Untereinheiten zugeordnet werden.

Das Muster der ribosomalen Proteine aus *L. viridescens* wurde mit dem bekannten Muster aus *E. coli* verglichen. In *L. viridescens* sind 20 Proteine der 30S- und 40 Proteine der 50S-Untereinheiten zu identifizieren.

L. viridescens besitzt 2 Proteine der 30S- und mindestens 3 Proteine der 50S-Untereinheit mehr als *E. coli*, die einen isoelektrischen Punkt niedriger als pH 8,6 haben.

Die durchschnittlichen Molekulargewichte der ribosomalen Proteine in beiden Stämmen sind ähnlich.

13 Proteine beider Stämme wandern in der zweidimensionalen Elektrophorese in die gleiche Position, sind aber nicht identisch.

Die ribosomalen Proteine der 70S-Ribosomen beider Stämme zeigen unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung. Alle Unterschiede zwischen den ribosomalen Proteinen aus *L. viridescens* und *E. coli* können aufgrund der geringen Verwandtschaft erklärt werden.

Die Ribosomen und ribosomalen Proteine aus *L. viridescens*-Zellen, die einem intensiven Thiamin-Mangel ausgesetzt waren, zeigten starke Veränderungen im Vergleich zu Ribosomen und ribosomalen Proteinen aus Optimal-Zellen.

Die Ribosomen erscheinen in ihrer Konformation verändert. Es können durch Essigsäurefällung der ribosomalen RNA Nucleoproteinpartikel isoliert und elektrophoretisch analysiert werden.

Die Aminosäureanalyse der gereinigten ribosomalen Proteine zeigt, daß im Thiamin-Mangel die Gehalte an Threonin, Methionin, Lysin und Arginin um 13 bis 15 % verringert sind. Es werden in der ersten Dimension der Elektrophorese der ribosomalen Proteine neue Banden entdeckt, die in der zweiten Dimension nicht mehr zu finden sind, weil sie einen niedrigeren isoelektrischen Punkt als pH 4,6 besitzen. Das zweidimensionale Muster der ribosomalen Proteine aus Mangel-Ribosomen ist leicht verändert.

Ein Protein (L2) und einige nicht identifizierte Flecken sind im Mangel nicht mehr vorhanden;
einige Proteine (S10, L6, L40) wandern in der zweiten Dimension langsamer;

andere (S3, S17) wandern dagegen schneller zur Kathode;
L1 und L11 werden stärker angefärbt;
L7 teilt sich in drei Flecken auf.

Dieses unterschiedliche Verhalten einiger ribosomaler Proteine im Thiamin-Mangel wird durch Veränderungen im isoelektrischen Punkt oder (und) des Molekulargewichts erklärt. Nach Zugabe von hohen Dosen Thiamin zu Mangel-Zellen erholen sich die Zellen nur langsam. Nach 45 Minuten Restauration sind alle Veränderungen, die an Ribosomen aus Mangel-Zellen beobachtet worden waren, noch nicht ganz aufgehoben.

Ribonucleoproteinpartikel können jetzt durch Essigsäurefällung der ribosomalen RNA kaum noch isoliert werden, die ribosomalen Proteine sind vollständig zu gewinnen.

Die ribosomalen Untereinheiten sedimentieren in $10^{-4}M$ Mg^{2+} -Saccharose-Dichtegradienten etwas langsamer als solche aus Optimal- und Mangel-Zellen.

Nur der Gehalt an Threonin bleibt im Gemisch der ribosomalen Proteine noch erniedrigt.

Das Muster der ribosomalen Proteine wird wieder annähernd normal. Die im Mangel zusätzlichen Banden in der ersten Dimension sind allerdings auch in der Restauration noch zu sehen.

Während der 45minütigen Restauration werden ribosomale Proteine neu synthetisiert und in ribosomale Vorläufer, in ribosomale Untereinheiten und in bisher noch nicht genauer charakterisiertes „70S“-Material eingebaut.

Gereinigte 70S-Ribosomen besitzen mindestens 7 neue Proteine der 30S- und 20 neue Proteine der 50S-Untereinheit. Wahrscheinlich sind diese Proteine „split“-Proteine.

Die Auswirkungen des Thiamin-Mangels auf Ribosomen in *L. viridescens* werden damit erklärt, daß die Energieversorgung in der Zelle unterbrochen und dadurch die Mg^{2+} -Konzentration für die Konformation der Ribosomen verändert ist.

F. Literatur

- 1) H.S. Anker
Febs Letters 7, 360, 1970
- 2) R.J. Avery, J.E.M. Midgley
Biochem.J. 122, 139, 1971
- 3) S.T. Bayley
J.Molec.Biol. 15, 420, 1966
- 4) N.V. Belitsina, A.S. Spirin
J.Molec.Biol. 52, 45, 1970
- 5) R. Böcker, L. Böhne, H. Kersten, W. Kersten
H.-S. Z.Physiol.Chem. 353, 1504, 1972
- 6) L. Böhne, W. Kersten
H.-S. Z.Physiol.Chem. 353, 1504, 1972
- 7) R. Brimacombe, J.M. Morgan, R.A. Cox
Eur.J.Biochem. 23, 52, 1971
- 8) R.J. Britten, R.B. Roberts
Science 131, 32, 1959
- 9) D.G. Brown, C. Baron, A. Abrams
BBA 168, 386, 1968
- 10) B.J. Mc Carthy
BBA 55, 880, 1962
- 11) F.N. Chang, J.G. Flaks
Proc.Nat.Acad.Sciences 67, 1321, 1970
- 12) A. Chrambach, D. Rodbard
Science 172, 440, 1971
- 13) P.S. Cohen, H.L. Ennis
BBA 145, 300, 1967
- 14) G. Corte, D. Schlessinger, D. Longo, P. Venkow
J.Molec.Biol. 60, 325, 1971
- 15) A. Cozzzone, J. Marvaldi, G. Marchis-Mouren
Biochem. 8, 4709, 1969
- 16) M.C. Craig
J.Molec.Biol. 55, 129, 1971

- 17) G.R. Craven, F. Voynow, S.J.S. Hardy, C.G. Kurland
Biochem. 8, 2906, 1969
- 18) A.E. Dahlberg, C.W. Dingman, A.C. Peacock
J.Molec.Biol. 41, 139, 1969
- 19) A.E. Dahlberg, A.C. Peacock
J.Molec.Biol. 55, 61, 1971
- 20) F.C. Davis, B.H. Sells
J.Molec.Biol. 39, 503, 1969
- 21) F.C. Davis, B.H. Sells
J.Molec.Biol. 49, 527, 1970
- 22) F.C. Davis, B.H. Sells
BBA 232, 379, 1971
- 23) F.C. Davis, B.H. Sells
BBA 262, 352, 1972
- 24) J. Delaunay, G. Schapira
BBA 259, 243, 1972
- 25) E. Deusser, H.G. Wittmann
Nature, 238, 269, 1972
- 26) G. Drews
Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissen-
schaftler
Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York
p. 102 ff., 1968
- 27) J.v. Duin, G.v. Dieijen, P.H. v. Knippenberg, L. Bosch
Eur.J.Biochem. 17, 433, 1970
- 28) M. Dzionara, E. Kaltschmidt, H.G. Wittmann
Proc.Nat.Acad.Sciences 67, 1909, 1970
- 29) Y. Eilam, D. Elson
Biochem. 10, 1489, 1971
- 30) B. Emmerich
Dissertation Med. Fak. Münster 1968
- 31) C.P. Flessel
J.Molec.Biol. 58, 579, 1971
- 32) R.F. Gesteland
J.Molec.Biol. 18, 356, 1966
- 33) L. Gierer, A. Gierer
J.Molec.Biol. 34, 293, 1968

- 34) N.G. Godson, R.A. Cox
BBA 204, 489, 1970
- 35) D. Goodman, H. Manor, W. Rombauts
J.Molec.Biol. 40, 247, 1969
- 36) W.E. Groves, F.C. Davis, B.H. Sells
Analyt.Biochem. 22, 195, 1968
- 37) L. Gürtler, H.J. Horstmann
Febs Letters 18, 106, 1971
- 38) R.S. Gupta, U.N. Singh
J.Molec.Biol. 69, 279, 1972
- 39) C. Guthrie, H.Nashimoto, M. Nomura
Cold Spr.Harb.Symp. 34, 69, 1969
- 40) S.J.S. Hardy, C.G. Kurland, P. Voynow, G. Mora
Biochem. 8, 2897, 1969
- 41) W.E. Hill, J.W. Anderegg, K.E. v. Holde
J.Molec.Biol. 53, 107, 1970
- 42) I. Hindennach, G. Stöffler, H.G. Wittmann
Eur.J.Biochem. 23, 7, 1971
- 43) H.E. Homann, K.H. Nierhaus
Eur.J.Biochem. 20, 249, 1971
- 44) K. Hosokawa, M. Nomura
J.Molec.Biol. 12, 225, 1965
- 45) H.H. Huang, J. Ma, B.C. Johnson
Biochem.Biophys.Res.Comm. 43, 847, 1971
- 46) M. Iwabuchi, M. Kono, T.O. Oumi, S. Osawa
BBA 108, 211, 1965
- 47) S. Iwata, K. Kaji
Proc.Nat.Acad.Sciences 68, 690, 1971
- 48) J. Julien, W. Kersten, B. Hess
H.-S. Z.Physiol.Chem. 349, 1249, 1968
- 49) J. Julien, H. Kersten, B. Hess
H.-S. Z.Physiol.Chem. 350, 1635, 1969
- 50) R.O.R. Kämpfer, M. Meselson, H.J. Raskas
J.Molec.Biol. 31, 277, 1968
- 51) L. Kahan, E. Kaltschmidt
Biochem. 11, 2691, 1972

- 52) E. Kaltschmidt, H.G. Wittmann
Analyt.Biochem. 36, 401, 1970
- 53) E. Kaltschmidt, M. Dzionara, H.G. Wittmann
Molec.Gen.Genet. 109, 292, 1970
- 54) E. Kaltschmidt, G. Stöffler, M. Dzionara, H.G. Wittmann
Molec.Gen.Genet, 109, 303, 1970
- 55) E. Kaltschmidt, H.G. Wittmann
Proc.Nat.Acad.Sciences 67, 1276, 1970
- 56) E. Kaltschmidt
Analyt.Biochem. 43, 25, 1971
- 57) E. Kaltschmidt, H.G. Wittmann
Biochemie 54, 167, 1972
- 58) W.S. Kelley, M. Schaechter
J.Molec.Biol. 50, 171, 1970
- 59) H. Kersten, K.H. Averkamp, W. Braatz, P. Greif,
W. Kersten, B. Hess
H.-S. Z.Physiol.Chem. 349, 1619, 1969
- 60) A. Kikuchi, R. Monier
Febs Letters 11, 157, 1970
- 61) C.R. Kossmann, T.D. Stamato, D.E. Pettijohn
Nature 234, 102, 1971
- 62) L.O. Krampitz
Ann.Rev.Biochem. 38, 213, 1969
- 63) C.G. Kurland
J.Molec.Biol. 2, 83, 1960
- 64) C.G. Kurland
Science 169, 1171, 1971
- 65) F. Lipmann
Science 164, 1024, 1969
- 66) W. Loh, H. Kersten
Abstr.Comm. 7th Meet. Eur.Biochem. Soc.
155, 1971
- 67) W. Loh, M. Farnbacher, L. Gürtler, H. Kersten
H.-S. Z.Physiol.Chem. 353, 1545, 1972
- 68) G. Marchis-Mouren, A. Cozzone, J. Marvaldi
BBA 186, 232, 1969

- 69) H. Maruyama, D. Mizuno
BBA 199, 159, 1970
- 70) H. Maruyama, M. Ono, D. Mizuno
BBA 199, 176, 1970
- 71) B. Mechler, B. Mach
Eur.J.Biochem. 21, 552, 1971
- 72) R. Miskin, A. Zamir, D. Elson
J.Molec.Biol. 54, 355, 1970
- 73) S. Mizushima, M. Nomura
Nature 226, 1214, 1970
- 74) W. Möller, J. Widdowson
J.Molec.Biol. 24, 367, 1967
- 75) W. Möller, R. Amons, C. Groene, R.A. Garrett,
C.P. Terhorst
BBA 190, 381, 1969
- 76) L.D. Moore, G.D. Schockman
Biochem.Biophys.Res.Comm. 24, 541, 1966
- 77) G. Mora, D. Donner, P. Thammana, L. Lutter,
C.G. Kurland
Molec.Gen.Genet. 112, 229, 1971
- 78) K. Nath, A.L. Koch
J.Biol.Chem. 246, 6956, 1971
- 79) M.W. Neal, J.R. Florini
Analyt.Biochem. 45, 271, 1972
- 80) M. Nomura, K. Hosokawa,
J.Molec.Biol. 12, 242, 1965
- 81) M. Nomura
Fed.Proc. 31, 18, 1972
- 82) T. Okamoto, M. Takanami
BBA 68, 325, 1963
- 83) S. Osawa, T. Itoh, E. Otaka
J.Bacteriol. 107, 168, 1971
- 84) E. Otaka, T. Itoh, S. Osawa
J.Molec.Biol. 33, 93, 1968
- 85) T. Oumi, S. Osawa
Analyt.Biochem. 15, 539, 1966

- 86) P. Pearson, H. Delius, R.R. Traut
Eur.J.Biochem. 27, 482, 1972
- 87) M.L. Petermann
Sub.-Cell.Biochem. 1, 67, 1971
- 88) J. Pichon, J. Marvaldi, G. Marchis-Mouren
Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 531, 1972
- 89) M. Raszka, M. Mandel
Proc.Nat.Acad.Sciences 68, 1190, 1971
- 90) D. Rodbard, A. Chrambach
Analyt. Biochem. 40, 95, 1971
- 91) A. Rodgers
BBA 217, 540, 1970
- 92) W. Rombauts, B. Peeters, H.G. Wittmann
Febs Letters, 18, 164, 1971
- 93) R. Rosset, C. Vola, J. Feunteun, R. Monier
Febs Letters 18, 127, 1971
- 94) H.G. Schlegel
Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1969
- 95) R. Schleif
J.Molec.Biol. 27, 41, 1967
- 96) R. Schleif
J.Molec.Biol. 37, 119, 1968
- 97) D. Schlessinger
J.Molec.Biol. 2, 92, 1960
- 98) D. Schlessinger, D. Aspirion
Ann.Rev.Microbiol. 23, 387, 1969
- 99) B.H. Sells, F.C. Davis
J.Molec.Biol. 47, 155, 1970
- 100) B.H. Sells, J. Sayler
BBA 232, 421, 1971
- 101) B.H. Sells, J. Sayler
BBA 232, 736, 1971
- 102) M.V. Shaw, R.L. Armstrong
J.Bacteriol. 109, 276, 1972
- 103) S.L. Shore, D.J. Phillips, C.B. Reimer
Analyt.Biochem. 31, 114, 1969

- 104) P.F. Spahr,
J.Molec.Biol. 4, 395, 1962
- 105) M.E. Spencer, I.O. Walker
Eur.J.Biochem. 19, 451, 1971
- 106) A.S. Spirin, N.V. Belitsina, E.B. Lishnevskaya
Febs Letters, 24, 219, 1972
- 107) P. Spitnik-Elson
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 557, 1965
- 108) P. Spitnik-Elson, B. Greenman
Febs Letters 17, 187, 1971
- 109) P. Spitnik-Elson, A. Breiman
BBA 254, 457, 1971
- 110) T.D. Stamato, D.E. Pettijohn
Nature 234, 99, 1971
- 111) G. Stöffler, H.G. Wittmann
Proc.Nat.Acad.Sciences 68, 2283, 1971
- 112) G. Stöffler, H.G. Wittmann
J.Molec.Biol. 62, 407, 1971
- 113) H. Suzuki, Y. Hayashi
BBA 87, 610, 1964
- 114) P.S. Sypherd
J.Molec.Biol. 56, 311, 1971
- 115) C.P. Terhorst, B. Wittmann-Liebold, W. Möller
Eur.J.Biochem. 25, 13, 1972
- 116) A. Tissières, J.D. Watson, D. Schlessinger,
B.T. Hollingworth
J.Molec.Biol. 1, 221, 1959
- 117) P. Traub, M. Nomura
Proc.Nat.Acad.Sciences 59, 777, 1968
- 118) P. Traub, M. Nomura
Cold Spr. Harb. Symp. 34, 63, 1969
- 119) R.R. Traut, H. Delius, C. Ahmad-Zadeh, T.A. Bickle,
P. Pearson, A. Tissières
Cold Spr. Harb. Symp. 34, 25, 1969
- 120) Z. Vogel, T. Vogel, A. Zamir, D. Elson
J.Molec.Biol. 54, 379, 1970

- 121) J.P. Waller
J.Molec.Biol. 10, 319, 1964
- 122) M. Webb
BBA 222, 416, 1970
- 123) D.L. Weller, R.E. Sjogren
BBA 200, 508, 1970
- 124) F.R. Williams
BBA 147, 427, 1967
- 125) H.G. Wittmann, G. Stöffler, I. Hindennach, C.G. Kurland,
L. Randall-Hazelbauer, E.A. Birge, M. Nomura,
E. Kaltschmidt, S. Mizushima, R.R. Traut, A. Bickle
Molec.Gen.Genet. 111, 327, 1971
- 126) H.G. Wittmann
Biochem.J. 129, 30P, 1972
- 127) B. Wittmann-Liebold
H.-S. Z. Physiol.Chem. 352, 1705, 1971
- 128) B. Wittmann-Liebold, H.G. Wittmann
BBA 251, 44, 1971
- 129) B.C. Wu, J.C. Arcos, M.F. Argus
Life Sciences 10, 541, 1971
- 130) K. Yoshida, S. Osawa,
J.Molec.Biol. 33, 559, 1968
- 131) R.M. Young, D. Nakada
J.Molec.Biol. 57, 457, 1971
- 132) A. Zamir, R. Miskin, D. Elson
J.Molec.Biol. 60, 347, 1971
- 133) R.J. Ziegler, L. Daneo-Moore
J.Bacteriol. 105, 190, 1971

Lebenslauf

16. 10. 1940 Geboren in Düsseldorf-Kaiserswerth
als erstes von vier Kindern;
Vater: Dr. med. Friedrich-Wilhelm Loh,
Arzt;
Mutter: Dr. med. Helga Loh, geborene Bredt.
- 1946 - 1951 Besuch der Volksschule in Neuengeseke
Kreis Soest.
- 1951 - 1961 Besuch der Gymnasien in Soest, Höxter,
Castrop-Rauxel und Herne.
16. 2. 1961 Abitur an dem Gymnasium in Herne.
1. 4. 1961
bis
30. 6. 1962 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.
- Nov. 1962 Studium der Mathematik und Biologie,
bis
Juli 1965 später der Geographie, Biologie und
Chemie für das Höhere Lehramt in Würz-
burg und in Kiel.
- Okt. 1965 Studium der Biologie zur Diplomprüfung
bis
Juli 1969 in Würzburg
18. 10. 1967 Diplom-Vorprüfung für Biologie.
18. 8. 1969 Diplom-Hauptprüfung für Biologie in den
Fächern Zoologie mit Schwerpunkt Tier-
physiologie, Biochemie, Virologie und
Organische Chemie.
16. 3. 1968 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
bis
30. 9. 1969 für Zoologie (II) und Vergleichende Physio-
logie der Universität Würzburg.

1. 10. 1969 Wissenschaftliche Hilfskraft am Physio-
bis
30. 9. 1970 logisch-Chemischen Institut der Univer-
sität Erlangen-Nürnberg.
- ab 1.10.1970 Verwalter einer wissenschaftlichen
Assistentenstelle am Physiologisch-
Chemischen Institut der Universität
Erlangen-Nürnberg.
- ab 1.10.1969 Doktorand bei Frau Professor Dr. H. Kersten.
- ab Okt. 1970 Zweitstudium der Humanmedizin
30. 3. 1972 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
8. 10. 1971 Eheschließung mit Fräulein Gunhild Balzer,
Rechtsreferendarin, aus Bamberg.



Buchdruckerei Ludwig Müller Erlangen